

**Métodos analíticos para la determinación de capacidad antioxidante de aceites
esenciales**

Presentado por:

Oscar Eduardo Montealegre Cespedes

Como requisito para optar título de profesional

En Química.

Universidad Nacional Abierta Y A Distancia

Escuela De Ciencias Básicas, Tecnología E Ingenierías

Programa de Química

Ibagué – Tolima – Colombia

2021

**Métodos analíticos para la determinación de capacidad antioxidante de aceites
esenciales**

Presentado por:

Oscar Eduardo Montealegre Cespedes

Como requisito para optar título de profesional

En Química.

Directora:

July Alexandra Hernández López

Magister En Química

Profesor Ocasional Escuela De Ciencias Básicas,

Tecnología E Ingenierías.

Universidad Nacional Abierta Y A Distancia

Escuela De Ciencias Básicas, Tecnología E Ingenierías

Programa de Química

Ibagué – Tolima – Colombia

2021

NOTA DE ACEPTACION

Firma del presidente del jurado

Jurado

Jurado

Ibagué, Julio de 2021

Dedicatoria

A mi familia, a mi hijo Samuel y a todas las personas que de cualquier forma contribuyeron a que se realizara este documento.

Agradecimientos

A mi Mujer y a mi Madre, mujeres que me han apoyado en la trayectoria de mi vida.

A mis amigos y compañeros de trabajo, por su comprensión, consejo y ayuda durante este proceso.

A todos mis tutores que a lo largo de mi formación como Químico en la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, permitieron que llegara a este punto; en Especial a los tutores July Hernandez y Diego Marín.

Resumen

En esta monografía se examina el potencial antioxidante de los aceites esenciales, mediante la revisión bibliográfica de los diferentes métodos existentes para cuantificar dicha capacidad; de tal manera que lo que se plasma en este documento a continuación es la investigación que abarca varios conceptos, nociones y conocimientos relevantes al objeto de la investigación que brindan la posibilidad de un entendimiento mejor de lo que se plantea, para ello primeramente se repasa conocimientos básicos acerca del oxígeno, la oxidación, los antioxidantes y desde luego una revisión general de los aceites esenciales.

Luego, se estudia los métodos DPPH, ABTS o Test TEAC, ORAC, FRAP, TBARS y RANCIMAT; explicando la generalidad de cada uno y se finaliza con la revisión bibliográfica de distintos autores a nivel mundial de los cuales realizan la revisión de la capacidad antioxidante de distintos aceites esenciales con uno o más métodos nombrados anteriormente.

Lo anterior incluirá un importante ejercicio de vigilancia tecnológica y una recopilación documental de métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia, con el fin de brindar apoyo teórico y contribuir a la comunidad académica e investigativa desde la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD) en un escenario de investigación formativa desde los semilleros de investigación.

Palabras claves: Aceites Esenciales, Métodos Analíticos, Antioxidante.

Abstract

This monograph examines the antioxidant potential of essential oils, by means of a bibliographic review of the different existing methods to quantify said capacity; In such a way that what is reflected in this document below is the investigation that covers several concepts, notions and knowledge relevant to the object of the investigation that offer the possibility of a better understanding of what is raised, for this knowledge is first reviewed basics about oxygen, oxidation, antioxidants, and of course a general review of essential oils.

Then, the DPPH, ABTS or Test TEAC, ORAC, FRAP, TBARS and RANCIMAT methods are studied; explaining the generality of each one and ends with the bibliographic review of different authors worldwide, of which they carry out the review of the antioxidant capacity of different essential oils with one or more methods mentioned above.

The foregoing will include an important exercise in technological surveillance and a documentary compilation of analytical methods to determine the antioxidant capacity of a substance, in order to provide theoretical support and contribute to the academic and research community from the National Open and Distance University (UNAD) in a formative research setting from the research hotbeds.

Keywords: Essential Oils, Analytical Methods, Antioxidant.

Contenido

Introducción	10
Planteamiento del problema	12
Justificación.....	14
Objetivos y plan de trabajo	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
Plan De Trabajo (Proceso Metodológico).....	15
 Marco Teórico	 18
Aceite Esencial	18
Oxígeno y Oxidación.....	23
<i>Oxígeno</i> 23	
<i>Oxidación</i>	25
Antioxidantes.....	26
<i>Tipos De Antioxidantes</i>	28
Métodos Analíticos Para La Cuantificación De La Capacidad Antioxidante	32
<i>DPPH</i>	35
<i>ABTS o Test TEAC (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity o Capacidad Antioxidante Equivalente A Trolox)</i>	39
<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)</i>	42
<i>Ferric Reducing Ability Of Plasma O Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)</i> 45	
<i>TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species O Especies Reactivas Al Ácido Tiobarbitúrico)</i>	47
<i>Test RANCIMAT</i>	48
Capacidad Antioxidante De Los Aceites Esenciales.....	49
Conclusiones	60
Referentes Bibliográficos.....	62

Lista De Figuras

Figura 1. Frasco de Vidrio que contiene un aceite esencial.....	19
Figura 2. Ejemplo de Monoterpenos.....	21
Figura 3. Ejemplo de Sesquiterpenos naturales. Tomado de: Martínez, A. (2003)	21
Figura 4. Acciones de producción, protección y señalización de H ₂ O ₂	24
Figura 5. Molécula Vitamina C (Ácido Ascórbico)	27
Figura 6. Radical DPPH y su forma estable.....	36
Figura 7. Sal de diamonio ABTS.....	40
Figura 8. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds.....	40
Figura 9. Ejemplo de Reacción Método TEAC.....	41
Figura 10. Molécula de AAPH.....	44
Figura 11. Fundamento del método FRAP, mostrando la reducción de 2,4,6- TripiridilTriazina Férrica (TPTZ).....	43
Figura 12. Ejemplo de Reacción Método TBARS.....	48
Figura 13. Mecanismo simplificado de autooxidación de hidrocarburos y protección antioxidante.....	50

Lista De Tablas

Tabla 1. Antioxidantes conocidos que eliminan especies de Oxígeno activo.....	29
Tabla 2. Otras Especies de Oxígeno Activo y sus agentes Reductores conocidos...	32
Tabla 3. Actividad antioxidante de doce aceites esenciales utilizando las concentraciones correspondientes (A=50 g /L, B=20 g /L, C=10 g /L, D=5 g /L) medida por cuatro métodos diferentes: DPPH, FRAP, TBARS y RANCIMAT.....	51

Introducción

Esta monografía pretende realizar una revisión bibliográfica acerca de los métodos analíticos utilizados para medir la capacidad antioxidante en sustancias como los aceites esenciales, tomando como referente artículos científicos que además de entregar información acerca, también hablan de varios temas acorde al objeto de la investigación como por ejemplo el proceso oxidativo, los antioxidantes, entre otros.

El desarrollo del anterior planteamiento requiere la satisfacción de los siguientes objetivos particulares: mostrar la relación existente entre conceptos básicos como los aceites esenciales; los cuales son estructuras líquidas de compuestos etéreos extraídos de plantas aromáticas, más comúnmente por destilación al vapor; estos componen lo que se llama la "esencia" de una planta y suelen tener aromas agradables; del cual estos han sido usados durante milenios debido a que cuentan con beneficios para la salud, los cuales están bien documentados en los escritos antiguos (Valgimigli L et al., 2012). Igualmente, de la revisión de textos acerca del oxígeno y la oxidación (su protagonismo y relevancia en el ciclo bioquímico de los seres vivos); antioxidantes (que son, su importancia y como trabajan); y desde luego la revisión bibliográfica de los distintos métodos que existen para la medición de capacidad antioxidante de sustancias como el DPPH, ABTS, ORAC, FRAP, TBARS y el RANCIMAT.

Los objetivos anteriores dan cuenta de una investigación de tipo investigativo-bibliográfico, la cual pretende brindar una explicación y comprensión acerca de la importancia de la medición de la capacidad antioxidante en sustancias de origen natural, siendo que sustancias como estos aceites podrían contar con algunas de las propiedades beneficiosas, y se tiene que pueden llegar a ser antisépticas y antiinflamatorias, que hasta han sido respaldadas por

investigaciones científicas recientes (Adorjan B et al., 2010). Adicional en estas sustancias se han identificado centenas de compuestos (metabolitos secundarios) con puntos de ebullición enteramente bajos, y gracias a esta gran diversidad química de constituyentes, puede ser la razón de su estabilidad oxidativa. Por otra parte, a varios aceites esenciales se les han señalado que cuentan con propiedades antioxidantes, que pueden aprovecharse para preservar otros materiales, como los alimentos, de la rancidez. Así, la búsqueda de antioxidantes naturales con la capacidad de no ser tóxicos ha dado lugar a un gran número de estudios sobre la capacidad antioxidante de los Aceites Esenciales. Esto es especialmente notable porque se teme que los antioxidantes sintéticos más comunes (como el hidroxianisol butilado (BHA) o el butilhidroxitolueno (BHT)) son potencialmente nocivos para la salud humana (Lanigan, R. S. 2002; Aguilar, F. 2010).

Por último, la información para la presente investigación provino de fuentes de carácter primario y secundario, tales como artículos de revistas especializadas que exponen los temas de manera específica hasta artículos donde realizan la revisión de forma genérica o con poco detalle; pero que de igual forma logran contener información relevante para la indagación, que nos permite realizar la revisión global de la química de la oxidación, de los antioxidantes, la capacidad antioxidante de aceites esenciales, entre otros.

Planteamiento del problema

Muchos suplementos dietéticos antioxidantes y alimentos saludables se venden ampliamente en los países industrializados, así lo indica Radimer K. (2004). Estos suplementos dietéticos incluyen compuestos como polifenoles, resveratrol (tomado de semillas de uva u hojas de arce), productos ACES (β -caroteno (pro-vitamina A), vitamina C, vitamina E, selenio: Selenium), y otros. Algunas vitaminas y minerales antioxidantes en los alimentos son esenciales para la salud, pero ¿son estos suplementos dietéticos antioxidantes beneficiosos o dañinos? De ser así, ¿qué sustancias? ¿Cuánto debo tomar? Esa es una pregunta considerable, pregunta hecha por Stanner, SA. (2004); Shenkin, A. (2006) y Woodside, J. (2005).

De hecho, varios autores sostienen que la hipótesis de que los antioxidantes pueden prevenir enfermedades crónicas ha sido refutada, así lo dice Hail, Jr. (2008) en el artículo Cancer chemoprevention: a radical perspective. No obstante, todavía se puede indicar que personas que comen más frutas y verduras corren menos riesgo de sufrir trastornos cardíacos y neurológicos como dice Stanner, SA. (2004), y existe evidencia de que algunas verduras y frutas pueden prevenir el cáncer. Se cree que estos materiales previenen algunas enfermedades, ya que estas son buenas fuentes de antioxidantes. Sin embargo, solamente los antioxidantes por sí solos no están directamente implicados en la prevención de enfermedades, ya que los ensayos clínicos de ingestión no tienen un efecto claro sobre el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardíacas; por lo tanto, la prevención de enfermedades puede involucrar otras sustancias en vegetales y frutas (por ejemplo, flavonoides) o mezclas complejas; así lo indica Cherubini, A. (2005) y Lotito, SB. (2006). Por ejemplo, con respecto a los alimentos y el cáncer, muchos alimentos contienen metabolitos activos que incluyen antioxidantes que son efectivos para

prevenir el cáncer, pero aislados de los activos no tienen efectos similares en la alimentación. En donde en algunos estudios, se demuestra que los ingredientes activos aislados de los alimentos han demostrado ser ineficaces para prevenir el cáncer. Sin embargo, se dice que la supresión del cáncer se reconoce al ingerir todo el alimento. Dicho lo anterior, se da a entender que el beneficio antioxidante de una sustancia daría mejores resultados o sería más efectivo, si y sólo si este componente antioxidante se consume originario de una planta, ya sea en frutos o en el consumo de los mismos, como en las verduras.

Aquí es donde entra a jugar un papel muy importante sustancias de origen natural como los Aceites Esenciales, siendo metabolitos secundarios extraídos de las plantas (sustancias que también se pueden obtener físicamente varias partes de la planta o tejido membranoso como lo afirma Turek, C. (2013)). Estas sustancias, además de contener componentes antioxidantes, tendrían otras que podrían potenciar su efecto, hacer de sinergista o simplemente permitir que estos actúen. De ahí la gran importancia de realizar la revisión bibliográfica de los distintos métodos existentes para medir la capacidad antioxidante de estas sustancias, para poder establecer a grandes rasgos cuál(es) podría(n) ser el(los) método(s) que describa(n) mejor esa capacidad y así lograr mostrar su posible potencial en el uso en la Industria en general.

Justificación

Definida la actividad antioxidante por Alu'datt, M. H. (2009) como la capacidad de los compuestos bioactivos para prevenir, retrasar y proteger contra la oxidación de diversos sustratos como el ADN y los materiales lipídicos, tanto en organismos vivos (por ejemplo, Humanos) como en productos alimenticios; se revela la importancia de lograr medir esta actividad en los compuestos químicos de naturaleza orgánica como lo son en este caso los aceites esenciales. Compuestos que, desde su descubrimiento y aplicación en la antigüedad, mediante su uso empírico evidenciaba propiedades especiales con múltiples aplicaciones, entre los más importantes su aplicación en la medicina popular, fragancias entre otros. A partir de 1960, algunos estudios han revelado la importancia de los antioxidantes en la salud, con divulgaciones acerca del impacto de los flavonoides, el ácido ascórbico y el estrés oxidativo contra el cáncer; tal cual como lo afirma Londoño, J. (2012). En la actualidad, en lugar de reseñar a los aceites esenciales como tal; las investigaciones generalmente discuten compuestos químicos determinados de los que están formados los aceites esenciales, como referirse al Salicilato de Metilo en vez del "Aceite de Gaulteria" (Nikolić, M. 2013).

Con lo dicho anteriormente la presente investigación se enfocará en la revisión bibliográfica de los métodos existentes para determinar la capacidad antioxidante de un aceite esencial; logrando contribuir mediante este trabajo a una de las misiones que tiene la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), que es ayudar a la sociedad mediante la investigación, con un aporte educativo; que se podrá llevar a cabo mediante la recopilación documental en esta Monografía.

Objetivos y plan de trabajo

Objetivo General

Compilar información acerca de los métodos analíticos empleados para la cuantificación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales, así como de conceptos afines que darán mayor claridad a las nociones en la investigación bibliográfica.

Objetivos Específicos

- Mencionar la relación existente entre conceptos básicos como los aceites esenciales; así como también de:
 - El oxígeno y la oxidación, su protagonismo y relevancia en el ciclo bioquímico de los seres vivos.
 - Antioxidantes, que son, su importancia y como trabajan.
- Recolectar información mediante la revisión Bibliografía, acerca de las técnicas cuantitativas existentes para evaluar la capacidad antioxidante de aceites esenciales.
- Enunciar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales, expuestos por distintos autores mediante la revisión de diferentes métodos.

Plan De Trabajo (Proceso Metodológico)

Para la ejecución de los objetivos se planteó un plan de trabajo que consta de seis (3) fases, con sus correspondientes actividades tal como se indica a continuación:

Fase I. Realización de la investigación bibliográfica, investigación de campo, documental o experimental.

Actividades: Mediante el uso de la base de Datos de webs como la Biblioteca Virtual de la UNAD, así como el uso de motores de Búsqueda como Google Académico; se realizó la búsqueda y relación de artículos, documentos y textos especializados sobre temas de antioxidantes, delimitando la búsqueda en información acerca de: proceso de oxidación, aceites esenciales, métodos de determinación de antioxidantes y caracterización fisicoquímica de actividad antioxidante de los aceites esenciales.

Fase II. Redacción previa del trabajo (borrador) y Revisión del contenido y la forma.

Actividades: Construcción del documento en donde se empieza por el apunte de breves ideas, asociación de pensamientos, anotación de citas bibliográficas, redacción de párrafos, dibujos, con lo que diseña un esbozo y levanta un armazón para construir el documento. Luego Se realiza la señalización de forma argumentada de las fortalezas y debilidades que se tiene en el trabajo, revisando sugerencias de forma e información que no se encuentra presentes y se recibe propuestas de bibliografía que aumentó la calidad del manuscrito. Estas indicaciones ayudaron a dotar al trabajo de mayor profundidad tanto en su desarrollo como en las conclusiones que se plantearon.

Fase III: Entrega del escrito final.

Actividades: Entrega del trabajo final que permiten contribuir al fortalecimiento del conocimiento en el área de la investigación de los antioxidantes en aceites esenciales.

Marco Teórico

En orden de aparición están escritos los temas que aquí se requiere dar una apertura o conocimiento elemental, en donde se logra explicar como por ejemplo qué papel juega el oxígeno y la oxidación, que son sustancias como el aceite esencial y los antioxidantes; y por último se realiza la revisión de los métodos analíticos más relevantes para la cuantificación de la capacidad antioxidante.

Aceite Esencial

Un aceite esencial es un aceite extraído de las plantas, que se usa para hacer perfume y en aromaterapia debido a su olor («essential oil», 2014). Esta sustancia es un líquido hidrófobo condensado que envuelve compuestos químicos etéreos (fácilmente evaporados a temperaturas normales) de las plantas. Los aceites esenciales además se conocen como aceites volátiles, aceites etéreos o concisamente como el aceite de la planta de la cual provienen, como el aceite de clavo.

Un aceite es "esencial" en el sentido de que contiene la "esencia" del aroma de la planta, perfume característico de la planta de la que provienen. Martínez, A. (2003), define el aceite esencial como fracciones líquidas volátiles que pueden ser destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que tienen importancia en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).

Figura 1. Frasco de Vidrio que contiene un aceite esencial.



Estas sustancias generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular como los:
 - Alcanos: Son hidrocarburos acíclicos saturados; se componen de solo elementos carbono (C) e hidrógeno (H), y tienen solo enlaces simples y no tienen anillos de carbono.
 - Alcoholes: Son compuestos orgánicos que contienen uno o más grupos hidroxilo (hidroxilo, -OH), directamente ligado a un átomo saturado de carbono (estar en el estado de sp^3 -hibridación). Los alcoholes pueden considerarse derivados del agua (H-O-H), en los que un átomo de hidrógeno se reemplaza por un grupo funcional: R-O-H.
 - Aldehídos: Son compuestos que contienen un grupo funcional con la estructura -CHO, que consiste en un carbonilo centro (un carbono doble unido a oxígeno) con el átomo de carbono también unido a

hidrógeno y a cualquier grupo R de cadena lateral o alquilo genérico. El grupo funcional en sí mismo (es decir, sin la cadena lateral "R") se conoce como grupo aldehído o formilo.

- Cetonas: son grupos funcionales con la estructura $R_2C=O$, donde R puede ser una variedad de sustituyentes que contienen carbono.

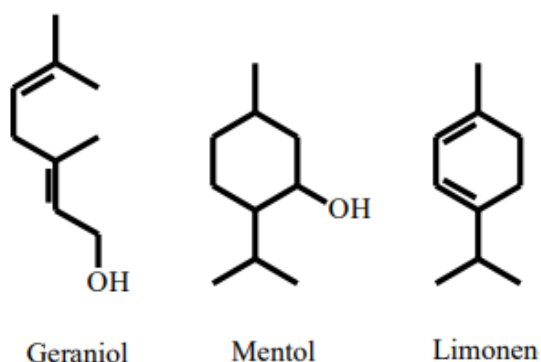
Las cetonas contienen un grupo carbonilo (un doble enlace carbono-oxígeno).

- Esteres: Son compuestos químicos derivados de un ácido orgánico en el que al menos un grupo $-OH$ (hidroxilo) se reemplaza por un grupo $-O-$ alquilo (alcoxi); normalmente, se derivan de la reacción de sustitución de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres de bajo peso molecular se utilizan comúnmente como fragancias y se encuentran en aceites esenciales y feromonas.

- Ácidos: Son moléculas o iones capaces de donar un protón (ion hidrógeno H^+) (un ácido de Brønsted-Lowry) o, alternativamente, capaces de formar un enlace covalente con un par de electrones (un ácido de Lewis).

- Monoterpenos, son una clase de terpenos que constan de dos unidades de isopreno y tienen la fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. Los monoterpenos pueden ser lineales (acíclicos) o contener anillos (monocíclicos y bicíclicos). Los terpenos modificados, como los que contienen funcionalidad de oxígeno o que carecen de un grupo metilo, se denominan monoterpenoides. Algunos ejemplos son:

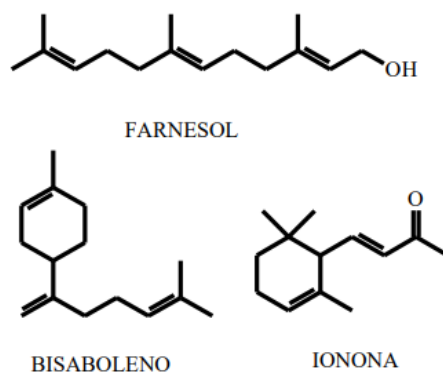
Figura 2. Ejemplo de Monoterpenos.



Tomado de: Martínez, A. (2003).

- Sesquiterpenos, son una clase de terpenos que constan de tres unidades de isopreno y, a menudo, tienen la fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. Al igual que los monoterpenos, los sesquiterpenos pueden ser acíclicos o contener anillos, incluidas muchas combinaciones únicas. Algunos ejemplos son:

Figura 3. Ejemplo de Sesquiterpenos naturales.



Tomado de: Martínez, A. (2003).

- Fenilpropanos, es un hidrocarburo aromático con la fórmula $C_6H_5CH_2CH_2CH_3$. La molécula consta de un grupo propilo unido a un anillo de fenilo. Es un líquido incoloro. Un isómero estructural más común de este compuesto es cumeno.

La mayoría de los fenilpropanos son de olor agradable, aunque existen algunos de olor desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados, Martínez, A. (2003).

De igual manera Conde, C.G (2012) indica que actualmente la “tendencia de los consumidores a nivel mundial se inclina a alimentos libres de productos sintéticos (pesticidas, insecticidas, fungicidas, fertilizantes, entre otros) y aditivos químicos (neutralizantes, preservantes, antioxidantes, colorantes, saborizantes)”, por lo que el autor recomienda “estudiar la actividad antioxidante de los aceites de plantas nativas, para recomendar su potencial uso como aditivos naturales; en donde se ha demostrado que el orégano y otros extractos de plantas, contienen sustancias antioxidantes, lo cual permitiría utilizarlos como aditivos en los alimentos” ;Londoño Londoño, J. (2012). Santana, E.P (2020), en su artículo “Estudio de las preferencias cárnicas de los adolescentes: hamburguesas de cerdo aderezadas con especias con poder antioxidante y antimicrobiano confirma lo que dice Conde, C.G (2012).

Ahora bien, Conde, C.G(2012) afirma que la evaluación de la actividad antioxidante de estos aceites extraídos de plantas como el cilantro, orégano y romero, en emulsiones de Agua/Aceite (margarina) y de Aceite/Agua, en un sistema de reacción donde el deterioro oxidativo se aceleró por medio de la radiación UVAVIS; reportó diferentes efectos antioxidantes, en donde como por ejemplo el aceite de orégano presentó mayor protección antioxidante, seguido por los de cilantro y romero. Otros autores han determinado la capacidad antioxidante de muchas especies, entre ellas: el

orégano y la infusión de té, debido a la presencia de polifenoles, ácido rosmarínico y flavonoides”; Londoño Londoño, J. (2012).

Oxígeno y Oxidación

Oxígeno

El oxígeno, elemento químico de símbolo O y número atómico 8. Es un miembro del grupo calcógeno en la tabla periódica, un no metal altamente reactivo y un agente oxidante que forma fácilmente óxidos con la mayoría de los elementos, así como con otros compuestos. Después del hidrógeno y el helio, el oxígeno es el tercer elemento más abundante en el universo en masa; (Emsley, J. 2011). A temperatura y presión estándar, dos átomos del elemento se unen para formar dióxigeno, un gas diatómico incoloro e inodoro con la fórmula O₂. El gas oxígeno diatómico constituye el 20,95% de la atmósfera terrestre. El oxígeno constituye casi la mitad de la corteza terrestre en forma de óxidos (Atkins et al., 2018).

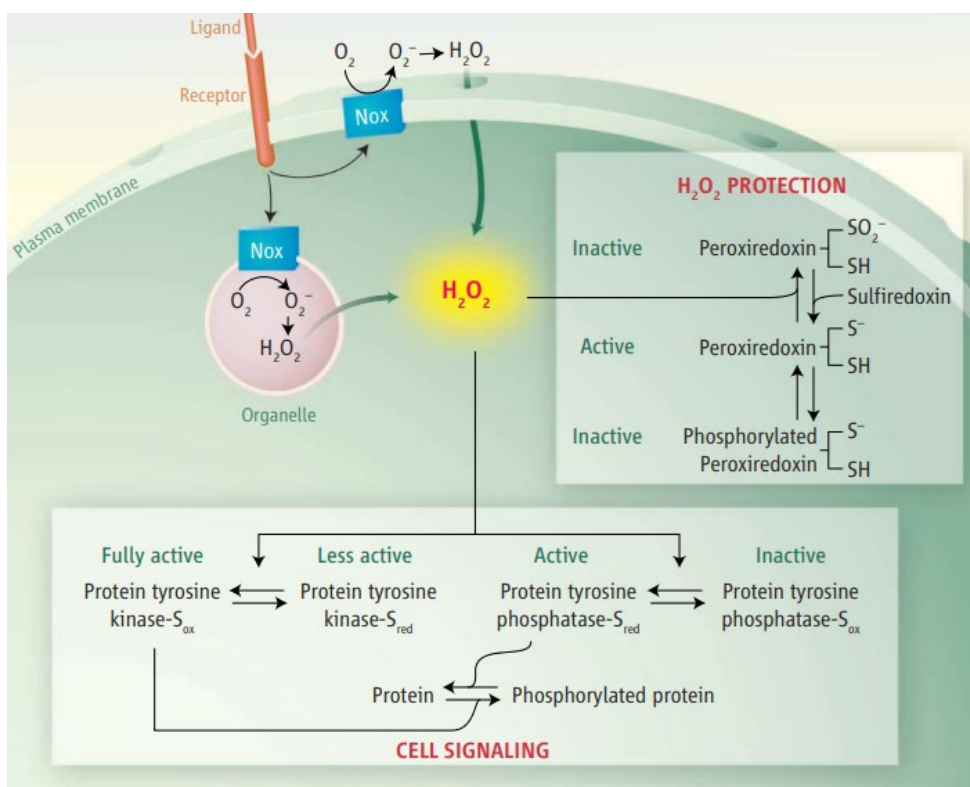
El dióxigeno proporciona la energía liberada en la combustión (Weiss H.M., 2008) y la respiración celular aeróbica, (Schmidt-Rohr, K. 2020) y muchas clases importantes de moléculas orgánicas en los organismos vivos contienen átomos de oxígeno, como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y grasas, al igual que los principales constituyentes inorgánicos. La mayor parte de la masa de los organismos vivos es oxígeno como componente del agua, el componente principal de las formas de vida.

En muchos organismos aeróbicos, la mayor parte del oxígeno molecular se consume en la producción de ATP en las mitocondrias, y finalmente se reduce

enzimáticamente a moléculas de agua. Este se convierte y se usa en pequeñas cantidades de oxígeno como sustrato para la enzima oxigenasa en la reacción metabólica de hidroxilación (Weiss, H.M. 2008; Schmidt-Rohr, K. 2020).

Así como también es digno de mención las especies reactivas de oxígeno, las cuales se generan dentro de los leucocitos como una sustancia bactericida y es llevada hasta las bacterias que luego son fagocitadas por los leucocitos, y por último son usadas como mediadores químicos locales en la señalización de oxígeno reactivo; donde el oxígeno se usa activamente en la fase en el cual el sistema metabólico controla el lugar de la formación y el objetivo de la reacción, tal cual como lo indica Rhee, S.G (2006) en su artículo *H₂O₂, a necessary evil for cell signaling*.

Figura 4. Acciones de producción, protección y señalización de H₂O₂.



Tomado de: Rhee, S. G. (2006).

Oxidación

Davies, K. J (1995) en su artículo *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*, recalca que las reacciones de oxidación que involucran oxígeno son extremadamente importantes para la vida, pero el oxígeno molecular como especie química, se puede convertir en una especie de oxígeno activo debido a su alta reactividad. Este proceso no es sólo bioquímico y no se limita necesariamente a la participación de sustancias biológicas y enzimas. Entonces, cuando se ajusta el entorno, el oxígeno (que es el mismo que está en los organismos vivos, en alimentos como la carne y otros), este oxígeno que es una sustancia química puede alterar o afectar negativamente el agua circundante, así como a los lípidos insaturados y a otras sustancias biológicas fácilmente oxidables a través del proceso de oxígeno activo, donde fácilmente puede activar una reacción. El proceso de oxígeno activo en este caso formaría una reacción de cadena radical, y convierte de raíz otras sustancias en radicales a partir del agua (la sustancia más abundante en el cuerpo vivo), o la Peroxidación lipídica que convierte en radicales peróxidos los lípidos y que pueden perjudicar aún más las células al reaccionar con los biomateriales circundantes para desnaturalizar las membranas, proteínas celulares y causar el rompimiento del ADN. Dicha reacción biológica se conoce como estrés oxidativo y contribuye a la causa del daño y muerte celular.

Este estrés oxidativo ha atraído la atención como una de las causas de muchas enfermedades humanas, y ha sido ampliamente estudiado o utilizado como candidato a fármaco o candidato a suplemento nutricional con el propósito de prevenir enfermedades y mantener la salud. Por ejemplo, la investigación sobre el tratamiento del accidente cerebrovascular y las enfermedades neurodegenerativas son notables tal como lo dice

Takaaki et al., (2009) en su artículo “*Señal de oxígeno reactivo y estrés oxidativo*”. Sin embargo, actualmente no se sabe si el estrés oxidativo es la causa ni el resultado de la enfermedad, y los antioxidantes todavía están en estudio en el campo de la medicina.

Por otro lado, se han comercializado muchas sustancias en el campo de los suplementos dietéticos, y los antioxidantes se utilizan ampliamente con el fin de mantener la salud y prevenir tumores malignos, enfermedades coronarias y mal de altura, como lo ilustra la *Enciclopedia de alimentos y alimentos funcionales y alimentos de nutrición para uso específico de la salud* (Takudo, O. 2006). Sin embargo, para algunos suplementos, los primeros estudios sugirieron que los antioxidantes suplementarios podrían mejorar la salud, pero los ensayos clínicos posteriores no encontraron efectos. Además, algunos informes indican que una sobredosis puede ser dañina (Baillie, J.K. 2009; Bjelakovic, G. 2007).

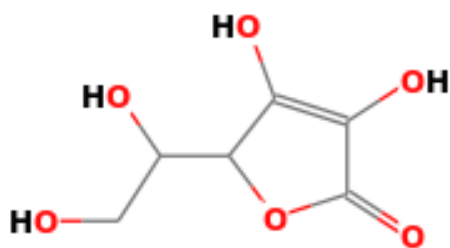
Por último, no está demás decir que, en el campo médico, la relación entre las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo está llamando la atención. En otras palabras, se descubrió que el estrés oxidativo está directamente involucrado en diversas enfermedades y fenómenos de envejecimiento, como el daño nervioso después de la recuperación de la isquemia cerebral y el peróxido de lípidos en el plexo arteriosclerótico exacerbaban el depósito aterogénico a través de una reacción inflamatoria.

Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que inhiben la oxidación. La oxidación es una reacción química que puede producir radicales libres, lo que lleva a reacciones en cadena que pueden dañar las células de los organismos (Sánchez N.F et al., 2019).

Para equilibrar el estado oxidativo, las plantas y los animales mantienen sistemas complejos de antioxidantes superpuestos, como el glutatión y las enzimas (por ejemplo: Catalasa y superóxido dismutasa), producidos internamente, o se pueden usar antioxidantes dietéticos como la vitamina C y vitamina E; que en este caso son llamados dietéticos porque los seres humanos no la logramos producir y requerimos adquirirlos mediante la alimentación.

Figura 5. Molécula Vitamina C (Ácido Ascórbico).



El término “antioxidante” se usa principalmente para dos grupos de sustancias completamente diferentes, donde algunos de los antioxidantes pueden ser sustancias de origen biológico, y algunos se sintetizan como aditivos para alimentos o materias primas industriales. El rango de uso de antioxidantes no se limita a la prevención de reacciones de oxigenación, sino que también se utiliza para detener las reacciones radicales y las reacciones redox generales, por lo que hay bastantes sustancias con diferentes aplicaciones, así lo indica Sies, H. (1997) en su artículo *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology: Translation and Integration*.

Ahora bien, siendo que la actividad antioxidante de este tipo de compuestos está definida por la reactividad química del mismo, la capacidad del antioxidante para entrar

hasta el sitio de reacción y la firmeza de los productos formados después del proceso de transformación de radicales libres, tal cual como lo indica Londoño, J. (2012); no está demás en afirmar que para hablar de algún antioxidante, su función o modo en el que reacciona, hay que lograr distinguir entre conceptos como capacidad antioxidante y reactividad, el cual la capacidad antioxidante da referencia acerca de la extensión del efecto antioxidante y la reactividad se define solo de la dinámica de inicio del resultado antioxidante a una densidad fija de compuesto; en otras palabras la capacidad antioxidante bien puede ser una acción estabilizadora de radicales libres o anti-radicales (en inglés, *scavenger*) o simplemente una actividad antioxidante donde está mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa y la actividad anti-radicales sería la reactividad de un antioxidante en cara a radicales libres, lo cual puede ser representado por la celeridad de una reacción.

Tipos De Antioxidantes

Se sabe que los antioxidantes como las vitaminas C y E suprimen de forma independiente las reacciones dañinas que involucran al oxígeno (Maestro-Durán, R. 1993). Estos antioxidantes se encuentran a menudo en sustancias con bajo peso molecular y a menudo provocan una reacción que detiene los radicales de oxígeno o los radicales derivados de ellos. Dado que muchos antioxidantes de molécula pequeña son buenos agentes reductores que se oxidan fácilmente, no solo reaccionan directamente con los radicales, sino que a menudo ayudan en las reacciones antioxidantes relacionadas con las enzimas, como se describe a continuación: “Cuando un antioxidante de molécula pequeña está directamente involucrado en la reacción, la selectividad de la reacción es

baja y varios oxidantes reaccionan con el antioxidante. Por otro lado, en la reacción antioxidante que involucra a la enzima, se determina el oxidante que reacciona con la enzima y el antioxidante de bajo peso molecular juega un papel como agente reductor” (Huang D, 2005).

Por otro lado, los antioxidantes de alto peso molecular se pueden dividir ampliamente en oxidasas y proteínas de transporte/almacenamiento de minerales. Es decir, hay una amplia variedad de oxidasas en el organismo vivo, y algunas de estas enzimas metabolizan la propia especie de oxígeno activo como sustrato, mientras que otras descomponen y metabolizan los peróxidos nocivos generados. También hay enzimas que reciclan "antioxidantes inactivos" como las vitaminas C y E, que se oxidan al reaccionar con oxidantes, devolviéndolos a su forma reducida. Por lo tanto, algunas oxidasas que están directa o indirectamente involucradas en el reciclaje y tienen un efecto antioxidante también se consideran como antioxidantes. (Huang D, 2005). En la Tabla 1 se muestran los ejemplos de sustancias antioxidantes y las EROS o ROS con la que reaccionan.

Tabla 1. Antioxidantes conocidos que eliminan especies de Oxígeno activo

Sustancia Antioxidante	Especies de oxígeno activo			
	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	·OH	¹ O ₂
Superóxido dismutasa	Si	No	No	No
Peroxidasa de glutatión	No	Si	No	No
Peroxidasa	No	Si	No	No
Catalasa	No	Si	No	No
Ácido ascórbico (VC)	Si	Si	No	Si
Cisteína	No	No	Si	No
Glutatión	No	No	Si	No
(Ácido linoleico ⇒ peróxido de lípidos)	No	No	Si	No
α-tocoferol (VE)	No	No	Si	Si
α-caroteno	No	No	Si	No

β-caroteno	No	No	Si	Si
Flavonoide	No	No	Si	No
Riboflavina (B₂)	No	No	No	Si
Bilirrubina	Si	No	No	No
ácido úrico	No	No	Si	Si

(González-Torres, M. C, et al 2000).

Muchas de estas oxidasas, que se consideran antioxidantes, consumen receptores de electrones como el glutatión y la vitamina C como sustratos. Es decir, la presencia de un antioxidante como agente reductor es indispensable para el metabolismo del peróxido por la enzima. Es necesario prestar atención a la característica de la enzima de que "la reacción enzimática es una reacción reversible y solo aumenta la velocidad de reacción". En otras palabras, la reacción inversa no importa porque hay abundantes receptores de electrones en el cuerpo vivo.

Sin embargo, en condiciones no biológicas como la nutrición y la ciencia de los alimentos, incluso la oxidasa, que se considera un antioxidante en el cuerpo vivo en algunas condiciones, acelera la reacción adversa que involucra al oxígeno en el estado procesado de los alimentos. Al hacerlo, los antioxidantes pueden agotarse o pueden generarse especies de oxígeno activo, lo que puede reducir la frescura y la calidad de los alimentos (Nakatani et al., 2006).

La mayoría de estas oxidasas tienen oligoelementos como átomos de hierro, manganeso, cobre y selenio en el centro de la actividad enzimática. Estos elementos metálicos son susceptibles a reacciones de oxidación-reducción (Haraguchi, 2005).

Por otro lado, el ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) en el cuerpo de estos oligoelementos debe estar en un estado oxidado específico. Por

ejemplo, el cuerpo no absorbe el hierro porque los iones de hierro (III) dependen de un transportador de membrana específico (Sekine, 2011); pero los iones de hierro (II) son quelatos (a veces de alto peso molecular como lactoferrina, ácido cítrico). Puede ser una molécula pequeña y se absorbe. Además, en el cuerpo, la transferrina se une a los iones de hierro (III) y se almacena y transporta. La especificidad de tal estado oxidado también se puede ver en otros minerales traza. Es decir, los oligoelementos se transportan y almacenan en un estado oxidado favorable a cada situación al quelar una pequeña molécula o una proteína específica. Incluso si es un oligoelemento, los iones de hierro pueden unirse a las enzimas y no convertirse en factores de deficiencia de enzimas, pero los iones metálicos pueden tener una función de oxidación-reducción en el medio ambiente del cuerpo vivo.

Sin embargo, en muchos casos, los oligoelementos tienen una función de oxidación-reducción solo cuando se colocan en el centro activo de la enzima como factor de deficiencia enzimática en el medio ambiente del organismo vivo. En cualquier caso, la oxidasa que incorpora oligoelementos cataliza la acción antioxidante de una manera específica del sustrato, por lo que los oligoelementos son la clave del sistema biológico antioxidante en el que participa la oxidasa.

La abundancia de oxidasa también es una molécula involucrada en el transporte y almacenamiento de oligoelementos, que es una sustancia biológica que quela los oligoelementos de bajo o alto peso molecular, pero si esas sustancias quelantes son deficientes, la abundancia de enzimas indirectamente provoca fluctuaciones en la función antioxidante del organismo vivo (Nakatani, 2006; Haraguchi, 2005).

Por tanto, las sustancias quelantes como la transferasa y la ferritina se consideran antioxidantes desde la perspectiva del sistema biológico.

Ahora por último tomando como base la información de la Tabla 1 en donde se muestra las sustancias de especies de oxígeno activo más conocidas y sus agentes reductores(antioxidantes); se tiene que para:

Tabla 2. Otras Especies de Oxígeno Activo y sus agentes Reductores conocidos.

Sustancia Antioxidante	Otras especies de oxígeno activo					
	HOO [·]	ROO [·]	RO [·]	ROOH	O ₃	OCI ⁻
3,4-Dihidroxibenzaldehído	Si	No	No	No	No	No
Ácido ascórbico (VC)	No	No	No	No	No	Si
Ácido dihidrolipoico (DHLA)	No	Si	No	No	No	No
Ascorbato Peróxidasa	No	No	No	No	Si	No
Compuestos Fenólicos	No	No	Si	Si	Si	No
Diosgenina y Santonina	No	No	No	Si	No	No
Eugenol	No	No	No	Si	No	No
Fenoles (ArOH)	No	Si	Si	No	Si	No
Flavonoides	No	No	No	No	Si	No
Hidroxilamina indolinónica (IH)	Si	No	No	No	No	No
La N-acetilcisteína	No	No	No	No	No	Si
La nitecapona	No	Si	No	No	No	No
Lactoperoxidasa	No	No	No	No	No	Si
Moracin T	Si	No	No	No	No	No
Ubiquinonas endógenas (UQ)	Si	No	No	No	No	No
β-caroteno	No	Si	No	No	No	No

(González-Torres, M. C, et al 2000).

Métodos Analíticos Para La Cuantificación De La Capacidad Antioxidante

Si bien desde hace más de 10 años existen métodos para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia y con el correr de los años salen nuevos métodos, es cierto indicar que aún existe la urgencia de crear métodos unificados para medir capacidad

antioxidante, lo cual quedó manifestado desde junio del año 2004 en el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes llevado a cabo en Orlando, Florida, EUA.

Allí se estableció el propósito de profundizar acerca de la manera en la cual se demuestra la capacidad antioxidante de alimentos, fitoterapéuticos, nutracéuticos e intentar crear métodos analíticos que lograrán ser normalizados como operaciones de rutina, debido a que los métodos actuales exhiben resultados poco similares, entre otras desventajas.

Se busca entre otras cosas que dicho método ha de ser algo unificado para comprobar la capacidad antioxidante, el cual debería estar normalizado y debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Usar un radical biológicamente importante,
- Ser una técnica simple,
- Usar un punto final determinado y un mecanismo acreditado,
- Manejar instrumentación fácilmente disponible,
- Ser Reproducible,
- Ser parametrizable para medir antioxidantes lipofílicos/hidrofílicos y con radicales variados,
- Ser configurable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras. (Ronald, L. 2005)

Actualmente se tiene conocimiento de que los métodos existentes no logran reflejar por sí solo la “capacidad antioxidante total” de una muestra, puesto que esta especificación debería mostrar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos,

manifestar y diferenciar los muchos mecanismos antioxidantes existentes y valorar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas (Londoño Londoño, J. 2012).

Por lo cual se hace importante realizar la revisión de las particularidades de los métodos más manejados actualmente para medir capacidad antioxidante y describir en detalle las características de cada uno, haciendo hincapié en su principio de trabajo, logrando mostrar las ventajas y desventajas de cada uno; puesto que la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa espontánea de un sustrato, se puede describir mediante dos parámetros distintos: el factor estequiométrico (también denominado por algunos como capacidad antioxidante), es el número de radicales atrapados por una molécula antioxidante, y la reactividad, lo más importante en la determinación de la actividad antioxidante, que depende de la constante de velocidad de reacción entre los antioxidantes y los radicales portadores de cadenas (Valgimigli, L. 2012).

En principio, la mejor prueba o test antioxidante consiste en evaluar los efectos que un compuesto puede tener sobre la oxidación de un sustrato que se somete a las mismas condiciones que se encuentran en los diferentes sistemas. Sin embargo, las oxidaciones espontáneas suelen ser lentas a temperatura ambiente y, por lo tanto, puede llevar semanas o incluso meses ver efectos apreciables sobre la cinética de oxidación.

El estudio del proceso inhibido probablemente sería poco práctico en muchos casos, por esta razón, se ha propuesto investigar varios métodos para tener una aproximación de la actividad antioxidante, y sus diferencias frecuentemente consisten en el grado de simplificación realizado con respecto a los procesos oxidativos reales.

Dentro de la investigación bibliográfica se encontró que los siguientes métodos son los empleados cotidianamente y de los cuales se han realizado comparativos al intentar determinar la cuantificación de dicha capacidad antioxidante entre los aceites esenciales.

DPPH

Guija-Poma, E. (2015) indica que DPPH es la abreviatura común para el compuesto químico orgánico 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl, polvo cristalino de color oscuro compuesto de moléculas estables de radicales libres.

El DPPH tiene dos aplicaciones principales, ambas en investigación de laboratorio: una y más importante aplicación es ser un monitor de reacciones químicas que involucran radicales, más notablemente es un ensayo antioxidante común, en donde ofrece el primer enfoque para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras fuentes biológicas. Este es el método más simple, en el que el compuesto o extracto prospectivo se mezcla con la solución DPPH y se registra la absorbancia después de un período definido (Sagar, B. 2011).

Este método fue desarrollado por Blois (1958) con el punto de vista de determinar la actividad antioxidante de una manera similar usando un radical libre estable α , α -difenil- β -picrilhidrazilo (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394.33$).

El ensayo se basa en la medición de la capacidad de captación de antioxidantes hacia él. El electrón impar del átomo de nitrógeno en DPPH se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la correspondiente hidracina.

El DPPH se describe como un radical libre invariable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su grupo, de modo que las moléculas no se dimerizan, como casi todos los radicales libres.

La deslocalización también da lugar al color violeta vivo, con una absorción en solución de etanol en torno a 520 nm. Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede conceder un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida con pérdida de color violeta. Representando el radical DPPH por Z^* y la molécula donante por AH, la reacción primaria es:

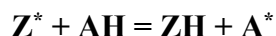
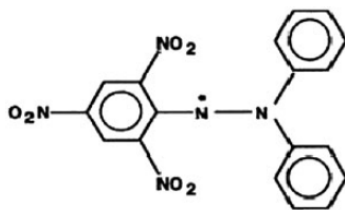
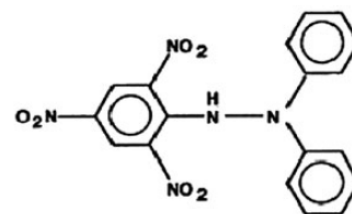


Figura 6. Radical DPPH y su forma estable.



Difetilpiperilhidrazilo (radical libre)



Difetilpiperilhidrazina (no radical)

Tomado de Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011).

Donde ZH es la forma reducida y A^* es el radical libre derivado en el primer paso. El último radical tendrá entonces reacciones adicionales que controlan la estequiometría global. Por lo tanto, la reacción inicial está destinada a proporcionar el enlace con las reacciones que tienen lugar en un sistema oxidante, tal como la autooxidación de un lípido u otra sustancia insaturada; la molécula DPPH Z^* está destinada a personificar los radicales libres creados en el sistema cuya actividad debe ser abolida por la sustancia AH. Si bien el DPPH puede aceptar que un electrón o un radical de hidrógeno se convierta en

una molécula diamagnética estable, solo se puede oxidar con dificultad y luego de manera irreversible. El DPPH muestra una banda de absorción fuerte a 517 nm debido a su electrón extraño y la solución aparece de un color violeta intenso, la absorción desaparece cuando el electrón se aparea. La decoloración resultante es estequiométrica con respecto al número de electrones absorbidos. Las soluciones alcohólicas de 0,5 mM están densamente coloreadas y, a esta concentración, se obedece la ley de Lambert-Beer en el rango útil de absorción. Es un método raudo, sencillo, económico y utilizado para medir la capacidad de los compuestos procediendo como captadores de radicales libres o dadores de hidrógeno, y para valorar la actividad antioxidante en alimentos. También se puede emplear para cuantificar antioxidantes en sistemas biológicos complejos, para muestras sólidas o líquidas. Este método es sencillo y se emplea para medir la capacidad antioxidante general (Prakash, 2001) y la actividad de disminución de radicales libres en jugos de frutas y verduras (Sendra et al., 2006). Este ensayo se ha utilizado con éxito para investigar las propiedades antioxidantes del grano y el salvado de trigo, verduras, ácidos linoleicos conjugados, hierbas, aceites de semillas comestibles y harinas en diferentes sistemas de disolventes diferentes, incluidos benceno, etanol, acetona acuosa, metanol y alcohol acuoso (Yu, 2001; Parry et al., 2005). Es un método útil para el estudio antioxidante de glutatión, cisteína, Vitamina C, tocoferol y compuestos aromáticos polihidroxílicos (Nishizawa M et al., 2005), para aceite de oliva, frutas, jugos y vinos (Sánchez-Moreno, 2002).

El método es único en realizar la reacción de la muestra con DPPH en metanol/agua, lo que facilita la extracción de compuestos antioxidantes de la muestra.

La determinación de la actividad antioxidante de varios tipos de alimentos utilizando DPPH es comparable a otros métodos. El análisis de antioxidantes por otros métodos puede limitarse a aquellos compuestos solubles en los disolventes seleccionados. La ventaja de este método es que se permite que el DPPH reaccione con toda la muestra y el tiempo suficiente en el método permite que el DPPH reaccione lentamente incluso con antioxidantes débiles (Prakash, 2001).

El método DPPH se puede utilizar en disolventes orgánicos acuosos y apolares y se puede utilizar para examinar antioxidantes hidrófilos y lipófilos (Prior et al., 2005). El ensayo DPPH se considera un método válido, preciso, fácil y económico para evaluar la actividad de eliminación de radicales de los antioxidantes, ya que el compuesto de radicales es estable y no es necesario generarlo. El DPPH es sensible a algunas bases de Lewis y tipos de solventes, así como al oxígeno. El DPPH solo puede ser soluble en solventes orgánicos y la interferencia de la absorbancia de los compuestos de la muestra podría ser un problema para el análisis cuantitativo (Arnao, 2000). La absorbancia de DPPH en metanol y acetona disminuye bajo la luz. El método DPPH tiene limitaciones para reflejar el reparto de antioxidantes en los sistemas de emulsión y no es útil para medir la actividad antioxidante del plasma, porque las proteínas se precipitan en el medio de reacción alcohólico.

Una lectura de las publicaciones en el pasado reciente muestra que varios grupos de investigación han utilizado protocolos muy diferentes que difieren en la concentración de DPPH (22,5-250 μM), tiempo de incubación (5 min-1 h), disolvente de reacción y pH de la mezcla de reacción. Las altas concentraciones de DPPH en la mezcla de reacción dan una absorbancia más allá de la precisión de las mediciones espectrofotométricas.

Como resultado de estas diferencias en las condiciones de reacción, los valores de CI50 incluso para los antioxidantes estándar como el ácido ascórbico y el hidroxitolueno butilado (BHT) varían mucho. Por tanto, no es posible comparar los resultados de diferentes laboratorios. La luz, el oxígeno y el pH de la mezcla de reacción también afectan la absorbancia de DPPH (Ozcelik, Lee & Min, 2003).

ABTS o Test TEAC (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity o Capacidad Antioxidante Equivalente A Trolox)

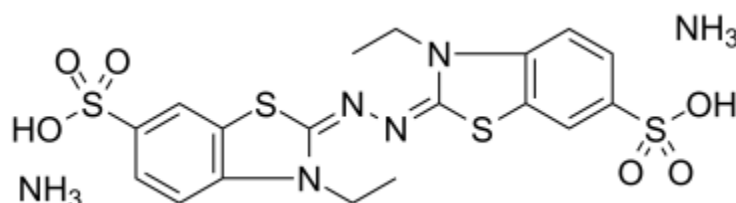
Este método sirve para la detección de la actividad antioxidante de una sustancia. Se destaca como ensayo de decoloración aplicable tanto a los antioxidantes lipofílicos como a los hidrofílicos, comprendidos los flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes plasmáticos. La monocación radical preformada del ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) se forma por oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de tales antioxidantes donadores de hidrógeno. Al determinar la actividad antioxidante, se tiene en cuenta la concentración de antioxidante como la duración de la reacción sobre la inhibición de la absorción de cationes radicales, (Pellegrini, 1999).

En bioquímica, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) es un compuesto químico empleado para observar la cinética de reacción de enzimas específicas. Un uso común es en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar la unión de moléculas entre sí.

Se utiliza como sustrato peróxido de hidrógeno para una enzima peroxidasa (como la peroxidasa de rábano picante) o solo con enzima oxidasa multicomponente azul

(como lactasa o bilirrubina oxidasa). Su uso permite seguir la cinética de reacción de las propias peroxidasas. De esta manera, también se puede usar para seguir indirectamente la cinética de reacción de cualquier enzima productora de peróxido de hidrógeno, o simplemente para cuantificar la cantidad de peróxido de hidrógeno en una muestra (M, J. 2017).

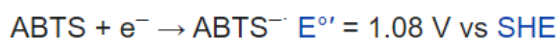
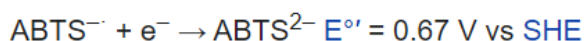
Figura 7. Sal de diamonio ABTS.



El potencial de reducción formal para ABTS es lo suficientemente alto como para que actúe como donante de electrones para la reducción de especies oxo como el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno, particularmente en los valores de pH menos extremos encontrados en la catálisis biológica. En estas condiciones, los grupos sulfonato están completamente desprotonados y el mediador actúa como un dianión (M, J. 2017).

Por ejemplo:

Figura 8. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds.

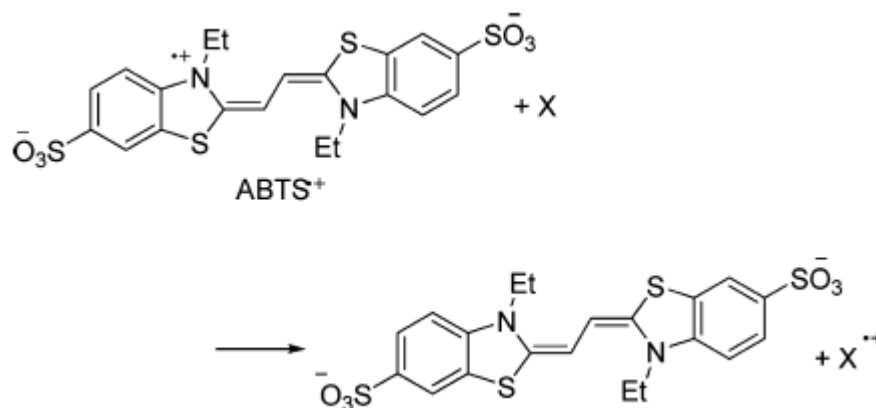


Se elige este compuesto porque la enzima facilita la reacción con el peróxido de hidrógeno, convirtiéndolo en un producto final verde y soluble. Su nuevo máximo de absorbancia de 420 nm de luz ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Shin, K. S. & Lee, Y. J. 2000) puede seguirse fácilmente con un espectrofotómetro, un instrumento común de

laboratorio. A veces se utiliza como parte de un reactivo de estimación de glucosa cuando se encuentran concentraciones de glucosa en soluciones como el suero sanguíneo.

El ABTS también se utiliza con frecuencia por la industria alimentaria y los investigadores agrícolas para medir las capacidades antioxidantes de los alimentos (Huang, D. 2005). En este ensayo, ABTS se convierte en su catión radical mediante la adición de persulfato de sodio. Este catión radical es de color azul y absorbe la luz a 734 nm. El ABTS catión radical reactivo frente a la mayoría de los antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos, tioles y vitamina C (Walker, R. B 2009). Durante esta reacción, el radical catión azul ABTS se convierte de nuevo a su forma neutra incolora. La reacción puede controlarse espectrofotométricamente. Este ensayo a menudo se denomina Ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox – TEAC (Roginsky, V, 2005). La reactividad de los diversos antioxidantes probados se comparó con la de Trolox, que es un análogo soluble en agua de la vitamina E.

Figura 9. Ejemplo de Reacción Método TEAC.



Tomado de: Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013).

Basado en las propiedades químicas especiales de los radicales libres formados, el ensayo ABTS se ha utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los productos alimenticios. Por ejemplo, los compuestos de polifenoles, que existen ampliamente en la fruta, pueden apagar los radicales libres dentro del cuerpo humano, evitando así el daño oxidativo de los radicales libres. La potencia antioxidante del extracto vegetal o del producto alimenticio se ha medido mediante el ensayo ABTS. Un ejemplo con método detallado es el análisis de la actividad antioxidante de los productos Hibiscus (Zhen, J. 2016).

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

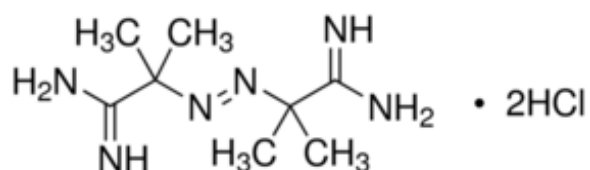
Autores como Zapata, S. (2014), definen este método de nombre Oxygen Radical Absorbance Capacity o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno, como un método de medición de capacidad antioxidante, el cual mide la actividad o capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para “apagar o neutralizar” radicales peróxidos. Otros autores dan detalles adicionales como que este método se emplea ampliamente para determinar el contenido de antioxidantes de los alimentos y utiliza fluoresceína como sonda para la oxidación de los radicales peróxido (Bisby et al., 2008).

El modelo cinético del ensayo ORAC sugiere que la fase de retraso para la pérdida de fluorescencia resulta del equilibrio entre los radicales antioxidantes y fluoresceína y el valor de la constante de equilibrio determina la forma de la fase de retraso. Para un antioxidante eficiente, esto constituye una reacción de “reparación” para los radicales fluoresceínico y produce una fase de retardo bien definida. Por último,

subrayan que los ensayos ORAC de fenoles con potenciales de oxidación variables, sugieren que podría emplearse para obtener una estimación del potencial redox de los antioxidantes en los materiales alimenticios. La medición ORAC es aplicable a antioxidantes solubles en agua (ORAC o H-ORAC) y solubles en grasa (L-ORAC). En comparación con otros métodos para determinar la capacidad antioxidante (por ejemplo, TEAC, FRAP), la medición ORAC observa la reacción antioxidante durante todo su curso y no solo la mide en un momento específico.

El método calcula la degradación oxidativa de la molécula luminiscente (ya sea beta-ficoeritrina o fluoresceína) posteriormente de mezclarse con productores de radicales libres como compuestos azoiniciadores. Se considera que los azoiniciadores originan el radical peroxilo por calor, lo que deteriora la molécula luminiscente y da como resultado la pérdida de luminiscencia. Se considera que los antioxidantes resguardan la molécula fluorescente de la degeneración oxidativa. El nivel de defensa se cuantifica mediante un fluorómetro. Actualmente, la fluoresceína se utiliza principalmente como sonda fluorescente. Los equipos que pueden medir y calcular automáticamente la capacidad están disponibles comercialmente. La intensidad fluorescente se acorta a medida que progresa la degeneración oxidativa, y esta intensidad se muestra típicamente durante 35 minutos después de la adición del azoiniciador (generador de radicales libres). Hasta ahora, AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propano) diclorhidrato o α,α' - Diclorhidrato de azodiisobutiramidina):

Figura 10. Molécula de AAPH.



Es el único productor de radicales libres utilizado. La degeneración (o descomposición) de la fluoresceína se mide a medida que la presencia del antioxidante ralentiza la disminución de la fluorescencia. Se registran las curvas de descomposición (el grado de fluorescencia frente al tiempo) y se calcula el área entre las dos curvas de descomposición (con o sin antioxidante). Posteriormente, se cuantifica el grado de resguardo mediada por antioxidantes utilizando el antioxidante trolox (un análogo de la vitamina E) como estándar. Se utilizan varias concentraciones de trolox para hacer una curva estándar y las muestras de prueba se comparan con esta. Los resultados de las muestras de prueba (alimentos) se publicarían como “equivalentes de trolox” o TE. (Garrett, A. R. 2010)

Uno de los beneficios de utilizar el método ORAC para valorar las capacidades antioxidantes de las sustancias es que tiene en cuenta prototipos con y sin fases de retraso de sus capacidades antioxidantes. Esto es especialmente útil cuando se miden en alimentos y suplementos que cuentan con ingredientes complejos de varios antioxidantes de acción tardía y rápida, así como materiales con resultados combinados que no se pueden calcular previamente.

Las dificultades con el uso de este método son:

- 1) Sólo se mide la actividad antioxidante contra radicales específicos (probablemente primariamente peroxilo); aunque, nunca se ha probado la formación de radicales peroxilo;
- 2) No se caracteriza la naturaleza de la reacción dañina;
- 3) No hay seguridad de que los radicales libres estén involucrados en esta reacción;
- 4) No hay certeza de que los datos ORAC contengan alguna importancia de interés biológico luego del consumo de cualquier alimento. Además, no se ha establecido la relación entre los datos ORAC y un verdadero beneficio para la salud. Como resultado de la refutación científica de la importancia fisiológica de ORAC, el USDA, que había estado recopilando y publicando datos de ORAC durante más de una década, retiró su publicación web de los valores de ORAC para alimentos estadounidenses comunes en mayo de 2012.

Se han propuesto varios métodos ORAC modificados. La mayoría de ellos emplean el mismo principio (es decir, medición del daño de la fluoresceína mediado por radicales AAPH); sin embargo, ORAC-EPR, método ORAC basado en resonancia paramagnética de electrones, mide directamente la disminución del nivel de radicales AAPH mediante la acción depuradora de la sustancia antioxidante (Kohri, S. 2009).

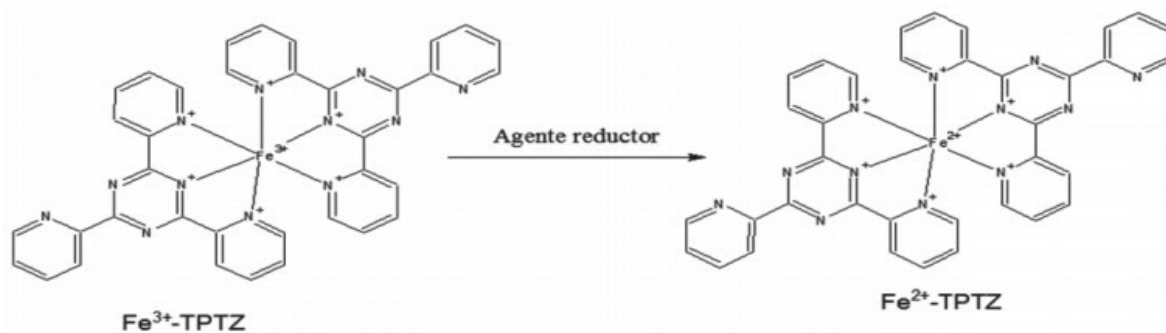
Ferric Reducing Ability Of Plasma O Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Benzie, I. F (1996), define FRAP como “Ferric reducing ability of plasma o Poder de reducción antioxidante del ion férrico”, es un método simple y automatizado que mide

la capacidad reductora férrica del plasma, la reducción de iones férricos a ferrosos a pH bajo que provoca la formación de un complejo ferroso-tripiridiltriazina coloreado.

Autores como Huet Breña, C. (2017), indica que la prueba FRAP consiste en un método espectrofotométrico que calcula la reducción de un complejo creado por un cromógeno, regularmente de TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina), y hierro férrico (Fe^{3+}) sin color a un compuesto ferroso de un intenso color azul verdoso con antioxidantes en un medio ácido.

Figura 11. Fundamento del método FRAP, mostrando la reducción de 2,4,6-TripiridilTriazina Férrica (TPTZ).



Tomada de: Gómez Ruiz, L. R (2017).

Es muy sencillo y económico, pueden reducir varios antioxidantes no enzimáticos como es el caso de vitamina C y otros como ácido úrico, entre otros; pero no determina los antioxidantes que tienen grupos SH, tal como la glutatona, ácido tióctico y algunos aminoácidos, ya que estos no reducen de forma eficiente el Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Se trata de un método espectrofotométrico en el que se calcula la absorbancia del compuesto de Hierro. Así, cuanto más antioxidante es la sustancia en estudio, mas es la reducción y la concentración de Fe^{2+} y por ende mayor la señal de absorbancia. El

compuesto va a poder ser reducido por productos con características redox menores a 0,7 V (Gómez Ruiz, L. R 2017).

Debido al grado del poder redox del Fe^{3+} -TPTZ es semejante con el del ABTS, en donde se pueden examinar compuestos equivalentes con ambos métodos; no obstante, las circunstancias de la reacción son diferentes.

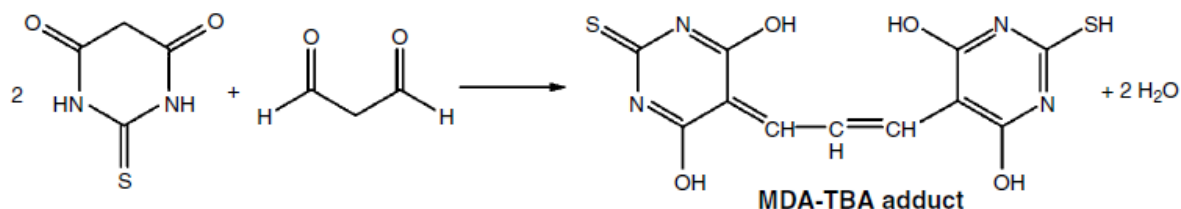
El componente del FRAP es de transmisión de electrones, en contraste de otros métodos donde se provoca captura de radicales libres; según esto, el FRAP puede ser ventajoso, en combinación con otros métodos, en la cuantificación de la capacidad antioxidante de productos que tengan diferentes tipos de antioxidantes. (Floegel et al., 2011)

TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species O Especies Reactivas Al Ácido Tiobarbitúrico)

El malondialdehído (MDA) es un producto secundario formado por la peroxidación de lípidos insaturados. Esta especie de carbonilo reactivo es potencialmente mutagénica (Hartman, 1983). El aducto coloreado que forma el MDA con ácido tiobarbitúrico (TBA), a temperaturas relativamente altas (90–100°C) en condiciones ácidas, se correlaciona con la tasa de peroxidación (Ohkawa et al., 1979; Yagi, 1998). El aducto MDA-TBA está coloreado en rosa y se puede determinar colorimétricamente (λ ~532nm) o fluorométricamente (excitación λ a 532 nm y emisión a 553 nm) (Cayman, 2016). La presencia de antioxidantes eficientes en el sistema determina una formación más lenta de hidroperóxidos lipídicos y, por lo tanto, una menor concentración de MDA y MDA-TBA.

La determinación de MDA se puede realizar en varios materiales sujetos a peroxidación. Los kits de ensayo disponibles comercialmente permiten la determinación de MDA en plasma, suero y orina humanos (Cayman, 2016). Los homogeneizados de tejidos, los lisados celulares y las muestras biológicas en general (como los alimentos) también se pueden analizar con el ensayo TBARS (Cayman, 2016). Sin embargo, se ha cuestionado la especificidad de este ensayo ya que la TBA también puede reaccionar con compuestos distintos del MDA (Amorati & Valgimigli, 2015).

Figura 12. Ejemplo de Reacción Método TBARS.



Tomado de: Amorati, R., & Foti, M. C. (2017).

Test RANCIMAT

El test de Rancimat consiste en la determinación de productos de reacción secundarios volátiles formados por la peroxidación espontánea de aceites o grasas (Viuda - Martos et al., 2010). La oxidación es provocada por una corriente de aire caliente (90-120°C). Los compuestos de oxidación volátiles, transportados por la corriente de aire y absorbidos en un recipiente que contiene agua desionizada, generan en la solución una conductividad eléctrica que aumenta con el tiempo. El tiempo de retraso hasta que se forman estos compuestos ionizantes se denomina período de inducción. Esta resistencia a la aparición de productos de oxidación se debe a la acción antioxidante y a la

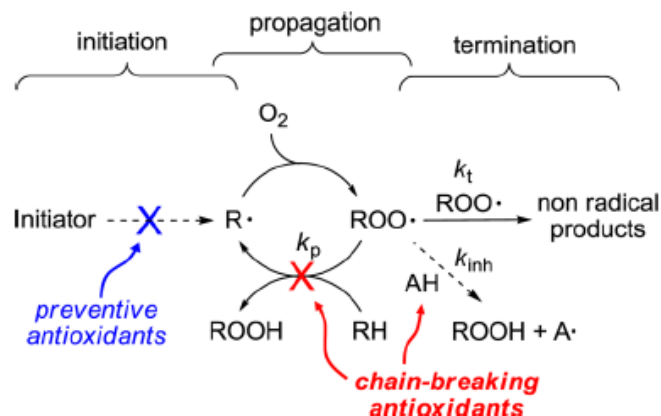
concentración de químicos presentes en la muestra. Por tanto, el tiempo de inducción caracteriza la estabilidad a la oxidación de aceites y grasas (Viuda - Martos et al., 2010).

Capacidad Antioxidante De Los Aceites Esenciales

Es una práctica común en el estudio de compuestos naturales para identificar a los antioxidantes como moléculas capaces de reaccionar con los radicales o provistas de poder reductor para contrarrestar el estrés oxidativo causado por los radicales. Este enfoque es atestiguado por la química en varias pruebas desarrolladas para analizar la actividad antioxidante de extractos naturales o fitoquímicos aislados, que se basan en la reacción del antioxidante potencial con algún radical persistente coloreado (por ejemplo, algunas especies oxidantes no radicales como los iones Fe^{3+} (ensayo FRAP)).

Este enfoque no es del todo correcto. Por definición, los antioxidantes son compuestos capaces de retardar o retrasar la oxidación de un material oxidable, incluso cuando se usan en una cantidad muy modesta (<1%, comúnmente 1 a 1000 mg/L) en comparación con la cantidad de material que tienen que proteger. Centrándonos en procesos de relevancia en los sistemas biológicos o en la ciencia de los alimentos, los materiales a proteger suelen ser lípidos, proteínas, carbohidratos y, en menor medida, otras moléculas orgánicas que componen los tejidos animales o vegetales. Su oxidación ocurre por una reacción en cadena de radicales mediada por radicales peroxilo ($\text{ROO} \bullet$) que es paralela a la autooxidación de los hidrocarburos (Valgimigli, L 2012).

Figura 13. Mecanismo simplificado de autooxidación de hidrocarburos y protección antioxidante.



Tomado de: Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013).

La Capacidad antioxidante de los aceites esenciales se atribuyen principalmente a los compuestos activos presentes en ellos. Esto puede deberse al alto porcentaje de constituyentes principales, pero también a la presencia de otros constituyentes en pequeñas cantidades o a la sinergia entre ellos (Abdalla, A. E 1999).

Ahora bien, Politeo, O. (2006), indica que los resultados que se resumen en la Tabla 3, se encontró que los aceites esenciales de las plantas analizadas Albahaca, Canela, Cilantro, Clavo, Everlast, Hinojo, Laurel, Mejorana, Menta, Nuez Moscada, Pimienta Negra y Salvia; mostraron capacidades antioxidantes muy diferentes. Una actividad más fuerte está indicada por un índice antioxidante más alto determinado por cada uno de los tres métodos diferentes: DPPH, FRAP y TBARS. En contraste, la prueba RANCIMAT mostró casi los mismos resultados para todos los aceites probados. Los resultados de la Tabla 3 sugieren que los aceites esenciales de tres plantas de especias, es

decir, clavo, albahaca y laurel, podrían usarse como una fuente potencial de antioxidantes naturales con posibles aplicaciones en los sistemas alimentarios.

Tabla 3. Actividad antioxidante de doce aceites esenciales utilizando las concentraciones correspondientes (A=50 g /L, B=20 g /L, C=10 g /L, D=5 g /L) medida por cuatro métodos diferentes: DPPH, FRAP, TBARS y RANCIMAT.

	DPPH				FRAP				TBARS				RANCIMAT
	% Inhibición				mmol/L				AI%				AAI
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A
Albahaca	93	93	88	85	78	25	13	7	45	29	26	22	1,1
Canela	14	9	7	6	<1	<1	<1	<1	-	-	-	-	0,9
Cilantro	88	69	44	30	12	5	2	<1	39	21	18	9	1
Clavo	94	93	93	93	740	440	131	88	65	49	32	22	1,5
Everlast	42	20	14	11	7	2	<1	<1	45	30	17	17	0,9
Hinojo	9	7	5	2	<1	<1	<1	<1	54	41	26	13	0,9
Laurel	93	89	80	68	22	10	4	2	38	18	4	1	1,1
Mejorana	29	15	11	9	3	1	<1	<1	70	50	49	26	1
Menta	38	20	12	8	<1	<1	<1	<1	36	19	12	5	0,9
Nuez	82	56	39	24	11	3	2	<1	67	40	30	24	1,1
Moscada													
Pimienta	61	37	22	14	11	3	1	1	36	36	27	16	0,9
Negra													
Salvia	14	6	5	5	2	1	<1	<1	27	10	9	<1	0,9

Politeo, O. (2006)

Con respecto a las actividades antioxidantes de los aceites esenciales de albahaca y laurel mostrado en la Tabla 3, parece interesante que mostraron buenas actividades antioxidantes a pesar de que los principales componentes de estos aceites, es decir, estragol y 1,8-cineol, no se conocen como antioxidantes potentes (Lee, S. J 2005).

La eficacia de esos aceites esenciales se debe probablemente a un contenido relativamente alto de eugenol (11,6%) y metil-eugenol en el aceite de albahaca (4,1%) y de metil-eugenol en el aceite de laurel (13,5%) (Politeo, O. 2006).

Los aceites esenciales de cilantro y nuez moscada podrían ser antioxidantes interesantes solo si se aplican a la concentración más alta probada. Dado que sus

componentes principales no se conocen como antioxidantes, se puede sugerir que la actividad antioxidante de ambos aceites esenciales se debe a sus componentes menores.

Los aceites esenciales de otras especias examinadas mostraron capacidades antioxidantes muy moderadas.

Con lo anterior se logra deducir que ningún método de prueba es suficiente para estimar la actividad antioxidante de los aceites esenciales, en donde también se demostró que la prueba RANCIMAT no es apropiada para tales investigaciones, porque la introducción de aire en los sistemas de medición calientes (grasa) durante la medición evapora los aceites esenciales previamente agregados y por lo tanto evita las mediciones adecuadas. Los resultados obtenidos con este método son ambiguos y pueden llevar a conclusiones incorrectas.

Otros autores que realizan este estudio de capacidad antioxidante indican en sus investigaciones lo siguiente:

- Los aceites esenciales adquiridos de órganos aéreos de plantas se analizan mediante GC-MS y se encuentran más de 100 compuestos, lo que indica el 95,5% de todos los compuestos de los aceites esenciales. Los componentes principales de los aceites esenciales incluyen monoterpeno oxigenado, cetona de artemisia (30,7%) y alcanfor (15,8%). Los aceites esenciales separados se prueban para determinar la actividad de eliminación de radicales mediante pruebas de DPPH, ABTS y ORAC. El aceite esencial no mostró una actividad antioxidante significativa en ninguna prueba; sin embargo, era comparable al timol, un antioxidante conocido (Ćavar et al., 2012).

- Al realizar una comparación de una película hecha de gelatina de escamas de pescado combinada con aceite esencial de limón mostró una alta actividad antioxidante en las pruebas ABTS y FRAP, y esta actividad antioxidante fue mayor en comparación con la bergamota (Tongnuanchan et al., 2012).
- Se estudió los aceites esenciales extraídos de frutos (*Foeniculum vulgare* var. *Dulce*, *Foeniculum vulgare* var. *Azoricum* y *Foeniculum vulgare* var. *Vulgare*) en cuanto a compuestos químicos y actividad antioxidante. El GC-MS mostró 18 monoterpenos en cada aceite esencial de las tres frutas, pero los porcentajes en estos tres tipos son muy diferentes. El estragole, el trans-anetol, el limoneno y la fenchone fueron abundantes en todos los aceites esenciales investigados. El resultado de las pruebas de antioxidantes indicó una alta actividad antioxidante de las frutas (Shahat et al., 2011).
- La actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Amomum tsao-ko* indican que estos aceites esenciales tienen una actividad antioxidante débil (Yang Y et al., 2010).
- El *O.glandulosum* se recolectó en tres lugares de Túnez y se evaluó la composición química y la actividad antioxidante de sus aceites esenciales. Los componentes principales de los aceites esenciales son timol, *p*-cimeno, carvacrol e γ -terpineno. La capacidad de eliminación de radicales (DPPH) en el rango de IC50 fue de 59 a 80 mg / L. Se detectó la correlación entre el contenido total de fenol de los aceites esenciales y la capacidad absorbente de radicales DPPH (Mechergui et al., 2010).

- Yang en 2010 comparó la actividad antioxidante de los aceites esenciales en plantas y frutas, incluyendo Lavanda, Menta, *Rosmarinus officinalis*, limón, uva e incienso. Los resultados indicaron que la actividad antioxidante de los aceites esenciales de lavanda fue mayor que la de otras plantas.
- Los aceites esenciales de cilantro y fruta *Carum carvi L.* mostraron una capacidad de captación de radicales contra los radicales DPPH (Samojlik et al., 2010).
- El aceite esencial de anís, cardamomo, canela, curcuma zedoaria, prikhom y jengibre indicó una actividad antioxidante significativa en las pruebas DPPH y FRAP. Estos aceites esenciales también mostraron niveles altos de fenoles totales (Nanasombat & Wimuttigosol, 2011).
- El uso de la prueba DPPH mostró que los aceites esenciales de *Semenovia tragioides* tenían una actividad antioxidante más débil. El componente principal de los aceites esenciales fue el acetato de lavandulilo (Bamoniri et al., 2010).
- Los aceites esenciales extraídos del corno de la planta mostraron una actividad antioxidante significativa superior a la del ácido ascórbico (Gourine et al., 2010).

- *Bunium persicum Boiss* es una planta medicinal e importante desde el punto de vista económico, que vive como una planta salvaje en las zonas áridas de Irán. Los principales componentes del aceite esencial de esta planta incluyen cariofileno (27,81%), *y*-terpineno (15,19%) y estado de comino (14,67%). La investigación de la actividad antioxidante de esta planta se realizó mediante pruebas de blanqueo de DPPH y β -caroteno. En el sistema DPPH, la cantidad de aceites esenciales IC50 se calculó en 0,88 mg/ml. La actividad Antioxidante del aceite esencial (0,45%) en β -caroteno es casi igual a BHT 0,01% (Shahsavari et al., 2008).

- La composición química del aceite esencial extraído de *Teucrium bisabolene* incluyó isocariofileno (20,24%), santaleno (11,27%), sesquiphellandreno (14,73%), cariofileno (7,18%) y dolicodial (9,38%) que mostraron actividad antioxidante significativa en la prueba DPPH (Ricci et al., 2005).

- La actividad antioxidante del aceite esencial de dos especies de *Achillea millefolium* mostró una actividad antioxidante significativa en la prueba de DPPH (Bozin et al., 2008).

- El aceite esencial de *Teucrium sauvagei* mostró una actividad antioxidante adecuada en las pruebas DPPH y ABTS (Bel Hadj Salah et al., 2006).

- El aceite esencial de hoja y flor de *Bidens pilosa* mostró una actividad antioxidante adecuada en la prueba DPPH (Deba et al., 2008).

- El aceite esencial de *Thymus* y *Origanum* mostraron actividad antioxidante que depende de la constitución química de los aceites esenciales y del método de selección para dicha actividad (Hazzit et al., 2006).
- Se investigó el aceite esencial de *T. capitellatus*, *T. camphoratus*, *T. carnosus*, *T. sylvestris*, *T. pulegioides*, *T. zygis* y *Thymus caespititius*, recolectados en diferentes áreas de Portugal. Los resultados indicaron su actividad antioxidante adecuada (Dandlen et al., 2010).
- Se midió la actividad antioxidante de los aceites esenciales, clavo (*Salvia Syzygiumaromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y salvia (*Salvia officinalis*); y su composición fenólica total. Los aceites esenciales de clavo tenían el fenol total más alto (898.89 mL/L GAE) y el porcentaje más alto de inhibición de radicales DPPH (98.74%) y la mayor cantidad de FRAP (1.47 TEAC). Los aceites esenciales de tomillo mostraron el mayor porcentaje de inhibición de TBARS (89,84%). Todos los aceites esenciales investigados fueron capaces de quelar el hierro (II) y los aceites esenciales de romero tuvieron el mayor efecto (76,06%) en este sentido. Los aceites esenciales de orégano mostraron la mayor actividad antioxidante en Rancimat (Viuda-Martos et al., 2010).
- Los aceites esenciales de *Foeniculum vulgare* Mill tenían la capacidad de eliminar radicales hasta IC50: 32,32 (mg/mL) (Anwar et al., 2009). La actividad

antioxidante de los aceites esenciales separados de los órganos aéreos de *Thymus capitatus tunecino* se investigó mediante métodos FRAP, DPPH y TBARS y se comparó con BHA y BHT. En el método FRAP, los aceites esenciales y los antioxidantes sintéticos no mostraron actividad antioxidante; sin embargo, en otros métodos, los aceites esenciales mostraron una mejor actividad antioxidante en comparación con los antioxidantes sintéticos. Los componentes principales de los aceites esenciales fueron carvacrol (62% -83%), p-cimeno (5% -17%), γ -terpineno (14% -2%) y β -cariofileno (4% -1%) (Bounatirou et al., 2007).

- Los aceites esenciales de *C. libanoticum* mostraron una capacidad de eliminación de radicales ($IC_{50} > 30$) (Demirci et al., 2007).
- La actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* se realiza mediante pruebas de DPPH y β -caroteno, en comparación con tres composiciones: β - pineno, α -pineno y 1,8-cineol. Los resultados indicaron que los aceites esenciales de esta planta tienen más actividad antioxidante en comparación con estas composiciones (Wang et al., 2008).
- Los aceites esenciales de *Ocimum basilicum L.* mostraron una actividad antioxidante adecuada, que en parte se relaciona con la temporada de cosecha de esta planta (Ijaz Hussain et al., 2008).

- La actividad antioxidante del aceite esencial de semillas negras fue apropiada y fue menor que la del extracto de romero. Se informa que esta mayor actividad antioxidante se debió a mayores cantidades de fenol en el extracto de romero en comparación con los aceites esenciales de semillas negras (Erkan et al., 2008).
- Los aceites esenciales de *Thymus caramanicus* mostraron una actividad antioxidante adecuada que fue menor que el extracto de esta planta. Los componentes principales de los aceites esenciales incluyeron: timol (3,3%), carvacrol (85,9%), p-cimeno (3,2%), γ -terpineno (1,8%) y borneol (1,3%) (Safaei-Ghomi et al., 2009).
- *Origanum syriacum* y el aceite esencial de *O. ehrenbergii* recolectados en el Líbano mostraron un poder significativo para eliminar los radicales DPPH (Loizzo et al., 2009).
- Se estudió la actividad antioxidante del aceite esencial de pomelo rosa (*Citrus paradise L.*), limón (*Citrus limon L.*), brotes de clavo (*Caryophyllus aromaticus L.*) y cilantro (*Coriandrum sativum L.*). La actividad antioxidante más alta y más baja se relaciona con la toronja y la yema de clavo, respectivamente (Misharina & Samusenko, 2008).
- Se investigó la actividad antioxidante del aceite esencial extraído de *Origanum glandulosum Desf.* Los aceites esenciales recolectados de diferentes áreas mostraron un alto grado de actividad antioxidante (Ruberto et al., 2002).

Lo dicho anteriormente por los autores indican generalmente que las investigaciones in vitro de la actividad antioxidante tienen algunas limitaciones que incluyen no considerar factores como la situación física del antioxidante y las condiciones ambientales, que pueden dar a que se presenten diferentes quimiotipos en los aceites esenciales que fueron revisados por los anteriores autores.

Conclusiones

Al término de la presente investigación monográfica se llega a las siguientes conclusiones:

Se señala la correlación existente entre los aceites esenciales y sustancias antioxidantes; ya que se expone claramente como los aceites esenciales (que se encuentran los materiales naturales), pueden tener varias propiedades útiles; especialmente la actividad de antioxidante y pueden llegar proteger compuestos contra la oxidación, pues sustancias como por ejemplo los compuestos fenólicos presentes en estos aceites esenciales consiguen aumentar la vida útil de muchas sustancias; gracias al efecto activo en contra del mecanismo de oxidación (presente en alimentos y en los seres vivos).

Se Recolectó información acerca de las técnicas cuantitativas existentes para evaluar la capacidad antioxidante: DPPH, ABTS, ORAC, FRAP, TBARS y RANCIMAT. Logrando identificar las más relevantes y/o efectivas en la investigación de sustancias como los aceites esenciales.

Se explicó cada método o técnica para la cuantificación de capacidad antioxidante, exponiendo al detalle del procedimiento y el resultado que se pueda obtener (en teoría) por cada uno y con la revisión de bibliográfica de varios autores; de los cuales se puede decir que al no existir un método para la cuantificación total de capacidad antioxidante en los Aceites Esenciales; se es trascendental primero conocer qué tipo de aceite es, que componentes químicos contendría, para así elegir el método idóneo para realizar dicha medición. Con lo anterior hay que tener en cuenta que un Aceite Esencial, es extraído de una planta y el estado de la misma

depende de las condiciones medioambientales; es decir este aceite esencial y sus características pueden variar según la zona, variedad, entre otros factores.

Referentes Bibliográficos

- Abdalla, A. E., & Roozen, J. P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food chemistry*, 64(3), 323-329.
- Adorjan, B., & Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
- Aguilar, F., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Grilli, S., ... & Leblanc, J. C. (2010). EFSA panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS): scientific opinion on the safety of allyl isothiocyanate for the proposed uses as a food additive. *EFSA J*, 8, 1943-1983.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Gammoh, S., Alkhalidy, H. A., Al-Mahasneh, M. A., ... & Masadeh, N. (2019). Fermented Malt Beverages and Their Biomedical Health Potential: Classification, Composition, Processing, and Bio-Functional Properties. In *Fermented Beverages* (pp. 369-400). Woodhead Publishing.
- Amorati, R., & Foti, M. C. (2017). Mode of Antioxidant Action of Essential Oils. *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*, 267-291.
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free radical research*, 49(5), 633-649.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10835-10847.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 419-421.
- Atkins, P., Jones, L., & Laverman, L. (2018). *Princípios de Química-: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*. Bookman Editora.
- Baillie, J. K., Thompson, A. A. R., Irving, J. B., Bates, M. G. D., Sutherland, A. I., Macnee, W., ... & Webb, D. J. (2009). Oral antioxidant supplementation does not prevent acute mountain sickness: double blind, randomized placebo-controlled trial. *QJM: An International Journal of Medicine*, 102(5), 341-348.
- Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Behpour, M., Kashi, F. J., & Batooli, H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. *Food chemistry*, 122(3), 553-558.

- Bel Hadj Salah, K., Mahjoub, M. A., Chaumont, J. P., Michel, L., Millet-Clerc, J., Chraeif, I., ... & Aouni, M. (2006). Chemical composition and in vitro antifungal and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *Teucrium sauvagei* Le Houerou. *Natural Product Research*, 20(12), 1089-1097.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bisby, R. H., Brooke, R., & Navaratnam, S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food chemistry*, 108(3), 1002-1007.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L. L., Simonetti, R. G., & Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *Jama*, 297(8), 842-857.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., ... & Pedro, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food chemistry*, 105(1), 146-155.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Vidic, D., & Parić, A. (2012). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia annua* L. from Bosnia. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 479-485.
- Cherubini, A., Vigna, G. B., Zuliani, G., Ruggiero, C., Senin, U., & Fellin, R. (2005). Role of anti-oxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Current pharmaceutical design*, 11(16), 2017-2032.
- Conde, C. G., Rueda, X. Y., & Patiño, G. G. S. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12-23.
- Dandlen, S. A., Lima, A. S., Mendes, M. D., Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Sousa, M. J., ... & Figueiredo, A. C. (2010). Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour and fragrance Journal*, 25(3), 150-155.
- Davies, K. J. (1995, November). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 61, pp. 1-31). Portland Press Limited.
- Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food control*, 19(4), 346-352.

- Demirci, B., Koşar, M., Demirci, F., Dinc, M., & Başer, K. H. C. (2007). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. *Food chemistry*, 105(4), 1512-1517.
- Emsley, J. (2011). *Nature's building blocks: an AZ guide to the elements*. Oxford University Press.
- Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food chemistry*, 110(1), 76-82.
- essential oil. (2014). Recuperado 26 de noviembre de 2020, de Oxford Learner's Dictionarie website: <https://www.oxfordlearnersdictionaries.com/definition/english/essential-oil>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & 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*, 24(7), 1043-1048.
- Garrett, A. R., Murray, B. K., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2010). Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. In *Advanced protocols in oxidative stress II* (pp. 251-262). Humana Press, Totowa, NJ.
- Gómez Ruiz, L. R. (2017). Evaluación de la Actividad Antioxidante en los Extractos Obtenidos por CO₂ Supercrítico de dos Especies Vegetales *Plantago Major* (Plantaginaceae) y *Arnica Montana* L (Asteraceae).
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3-9.
- Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., & Gaydou, E. M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 203-208.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 15(1), 57-60.
- Hail Jr, N., Cortes, M., Drake, E. N., & Spallholz, J. E. (2008). Cancer chemoprevention: a radical perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(2), 97-110.
- Haraguchi, H. (2005). *The world of life and metal* (1.^a ed., p. 157). Wakaba, Mihama-ku, Chiba City, Chiba, Japan: NHK Publishing.
- Hartman, P. E. (1983). Putative mutagens and carcinogens in foods. IV. Malonaldehyde (malondialdehyde). *Environmental mutagenesis*, 5(4), 603-607.

- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2006). Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(17), 6314-6321.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huet Breña, C. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, 108(3), 986-995.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., ... & Kotake, Y. (2009). An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical biochemistry*, 386(2), 167-171.
- Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of BHT (1). *International journal of toxicology*, 21, 19.
- Latruffe, N., Delmas, D., Jannin, B., Malki, M. C., Passilly-Degrace, P., & Berlot, J. P. (2002). Molecular análisis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent. *International journal of molecular medicine*, 10(6), 755-760.
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., & Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131-137.
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., ... & Frega, N. G. (2009). Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 117(1), 174-180.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Lotito, S. B., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727-1746.

- M, J., 2017. Antimicrobial Potentiality of *Ciissus Quadrangullariis* L on Selected Nosocomial Pathogens. 1st ed. Tumkur University.
- Maestro-Durán, R., & Borja Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y aceites*.
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod*, 59(1), 77-79.
- Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1745-1749.
- Misharina, T. A., & Samusenko, A. L. (2008). Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(4), 438-442.
- Nakatani, N., Shimizu, M., & Kojo, S. (2006). Food and health Food ingredients and functions - The Open University of Japan teaching materials (1.^a ed., p. 236). Wakaba, Mihama-ku, Chiba City, Chiba, Japan: The Society for the Promotion of Education, Broadcasting University.
- Nanasombat, S., & Wimmittigol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.
- Nikolić, M., Marković, T., Mojović, M., Pejin, B., Savić, A., Perić, T., ... & Soković, M. (2013). Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Industrial crops and products*, 49, 561-567.
- Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., & Niwano, Y. (2005). Non-reductive scavenging of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 53(6), 714-716.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Ozcelik, B., Lee, J. H., & Min, D. B. (2003). Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2), 487-490.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 566-573.

- Politeo, O., Jukić, M., & Miloš, M. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica chemica acta*, 79(4), 545-552.
- Prakash A (2001) Antioxidant activity. *Med Lab Anal Prog* 19(2):1–6.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Radimer, K., Bindewald, B., Hughes, J., Ervin, B., Swanson, C., & Picciano, M. F. (2004). Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *American journal of epidemiology*, 160(4), 339-349.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rhee, S. G. (2006). H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-1883.
- Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifano, F., Burini, G., & Curini, M. (2005). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 98(1-2), 195-200.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.
- Ruberto, G., Baratta, M. T., Sari, M., & Kaâbeche, M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(4), 251-254.
- Safaei-Ghomi, J.H., Ebrahimabadi, A., Djafari-Bidgoli, Z., & Batooli, H. (2009) Analytical Methods GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, 115: 1524–1528.
- Samojlik, I., Lakic, N., Mimica-Dukic, N., Đaković-Švajcer, K., & Bozin, B. (2010). Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8848-8853.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Santana, E. P. (2020). Estudio de las preferencias cárnicas de los adolescentes: hamburguesas de cerdo aderezadas con especias con poder antioxidante y antimicrobiano.

- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In *Antioxidants*. IntechOpen.
- Schmidt-Rohr, K. (2020). Oxygen Is the High-Energy Molecule Powering Complex Multicellular Life: Fundamental Corrections to Traditional Bioenergetics. *ACS omega*, 5(5), 2221-2233.
- Sekine, T. (2011). Molecular mechanism of iron abdominal ring feeding (1.^a ed., p. 73). Japan: Japanese Pharmacological Society.
- Sendra, J. M., Sentandreu, E., & Navarro, J. L. (2006). Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*, 223(5), 615.
- Shahat, A., Ibrahim, A.Y., Hendawy, A.F., Omer, S.A., Hammouda, E.M., Abdel-Rahman, F.H., & Saleh, F.A. (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules*, 16: 1366–1377.
- Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Naghdibadi, H. (2008). Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. *Plant foods for human nutrition*, 63(4), 183-188.
- Shenkin, A. (2006). The key role of micronutrients. *Clinical nutrition*, 25(1), 1-13.
- Shin, K. S., & Lee, Y. J. (2000). Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384(1), 109-115.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.
- Stanner, S. A., Hughes, J., Kelly, C. N. M., & Buttriss, J. (2004). A review of the epidemiological evidence for the ‘antioxidant hypothesis’. *Public health nutrition*, 7(3), 407-422.
- Takaaki Akaike, Keiichiro Suzuki, Koji Uchida, “Señal de oxígeno reactivo y estrés oxidativo”, número especial en medicina experimental, Vol.27, No.15, Yodosha, 2009. ISBN 978-4-7581-0301-5
- Takudo Okuda (2006), “Enciclopedia de alimentos y alimentos funcionales y alimentos de nutrición para uso específico de la salud”, Departamento de redacción de periódico farmacéutico de Kampo, Toyo Medical Co. ISBN 4-88580-153-2
- Technical bulletin from Cayman. (2016) <http://www.caymanchem.com/pdfs/10009055.pdf>

- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134(3), 1571-1579.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53.
- Valgimigli, L. (2012). Essential oils: an overview on origins, chemistry, properties and uses. *Essential oils as natural food additives*, 24.
- Valgimigli, L., & Pratt, D. A. (2012). Antioxidants in chemistry and biology. *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*.
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1), 13-19.
- Walker, R. B., & Everette, J. D. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1156-1161.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., & Fu, Y. J. (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food chemistry*, 108(3), 1019-1022.
- Weiss, H. M. (2008). Appreciating oxygen. *Journal of Chemical Education*, 85(9), 1218.
- Woodside, J. V., McCall, D., McGartland, C., & Young, I. S. (2005). Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4), 543-553.
- Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 101-106). Humana Press.
- Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H., & Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151.
- Yang, Y., Yue, Y., Runwei, Y., & Guolin, Z. (2010). Cytotoxic, apoptotic and antioxidant activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko*. *Bioresource Technology*, 101(11), 4205-4211.
- Yu LL (2001) Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J Agric Food Chem* 49:3452–3456.

Zapata, S., Piedrahita, A. M., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígenos (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectivas en nutrición humana*, 16(1), 25-36.

Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M. H., ... & Wu, Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Food chemistry*, 190, 673-680.