

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO A PARTIR DE LA ZANAHORIA NEGRA (<u>Daucus</u> <u>carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.</u>) PARA EL ESTUDIO DE BIOAPLICACIONES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Tecnología

PRESENTA:

ITARI SÁNCHEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MIRIAM ROCÍO ESTÉVEZ GONZÁLEZ









UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

En esta tesis se presenta la caracterización fisicoquímica y estudio de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en el extracto acuoso de zanahoria negra (*Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.*). Se emplearon técnicas de caracterización de espectrometría, así como colorimétricas. Dicho estudio se realizó con la finalidad de analizar los compuestos de tipo flavonoide presentes en esta hortaliza. Los resultados obtenidos de la caracterización mostraron un alto contenido de polifenoles y azúcares lo cual provee al extracto de una alta capacidad antioxidante. Estos resultados muestran que el presente trabajo puede ser extrapolado a campos de investigación en biomedicina como la síntesis de nanopartículas, así como en la industria alimentaria.

A DIOS Y A MI FAMILIA.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarnos la gran oportunidad de una excelente educación a nivel superior.

A mis profesores del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada por mi formación profesional.

Un especial agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Miriam Rocío Estévez González por todo su tiempo, dedicación y por brindarme la excelente oportunidad de formarme académicamente a su lado durante mi carrera universitaria.

Agradezco ampliamente al M. en C. Gustavo Andrés Molina Labastida, al Dr. José Antonio Maya Cornejo y al Dr. Héctor Paul Reyes Pool por todo su tiempo, conocimientos, apoyo y enseñanzas a lo largo de esta tesis.

A la Dra. Paola Cristina Bello Medina por su tiempo e instrucciones durante la redacción de este trabajo.

Agradezco a mi comité conformado por el Dr. Juan Francisco Pérez Robles, Dr. Ángel Ramón Hernández Martínez, Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña y al M. en C. Gerardo Antonio Fonseca Hernández por su apoyo durante la realización de este proyecto de investigación.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN209517 de la UNAM por el financiamiento recibido para la realización de esta tesis.

Contenido

RESUM	EN	III
AGRAD	ECIMIENTOS	v
	DE TABLAS	
	DE FIGURAS	
1 IN	itroducción	3
1.1	La importancia de los antioxidantes	3
1.2	Justificación	
1.3	Hipótesis	
1.4	Objetivo general	
1.5	Objetivos específicos	
2 AI	NTECEDENTES	8
2.1	Historia y distribución geográfica de la zanahoria negra	10
2.	1.1 Clasificación taxonómica	10
2.	1.2 Composición química de la zanahoria negra	11
3 A	CTIVIDAD ANTIOXIDANTE	13
3.1	Definición de antioxidante	13
3.2	Antioxidantes de origen natural	
3.	2.1 Clasificación de antioxidantes naturales	
3.3	Propiedades de los antioxidantes	17
4 IN	PORTANCIA DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	18
4.1	Definición de radical libre	18
4.2	ESTRÉS OXIDATIVO EN CÁNCER	18
5 M	IATERIALES	20
6 M	IETODOLOGÍA	21
6.1	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	21
6.2	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EL MÉTODO DE PH DIFERENCIAL	
6.3	Perfil cromatográfico mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	22
6.4	Espectroscopía UV-Visible	24
6.5	Espectroscopía Infrarroja	
6.6	POLIFENOLES TOTALES: MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU	
6.7	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES	26
6.8	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL RADICAL DPPH	
6.9	EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE CUPRAC ELECTROQUÍMICO	28
7 RI	ESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1	MÉTODO DE PH DIFERENCIAL	
7.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS COMPUESTOS EXTRAÍDOS DE LA ZANAHORIA NEGRA	
7.3	ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE	
7.4	Análisis de comportamiento en PH	33
7.5	Espectroscopía Infrarroja	34

7.6 POLIFENOLES TOTALES: MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU		35
7.7	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES	37
7.8	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL RADICAL DPPH	38
7.9	EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE CUPRAC ELECTROQUÍMICO	40
8 AP	PLICACIONES TECNOLÓGICAS	45
9 CC	DNCLUSIONES	47
10 BII	BLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ZANAHORIA NEGRA	10
TABLA 2. ANTIOXIDANTES NATURALES Y SUS FUNCIONES.	
TABLA 3. CONDICIONES DEL PROGRAMA DE GRADIENTE UTILIZADO DURAN	TE LA CROMATOGRAFÍA HPLC.
	23
TABLA 4. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL EXTR	
MEDIANTE HPLCTABLA 5. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EXPRESADO EN MG/L EQUI	31
TABLA 6. PROMEDIO DE VOLUMEN OBTENIDO PARA LA REDUCCIÓN DE COE	35 BRE UTILIZANDO GLUCOSA, ASÍ
COMO EL EXTRACTO DE ZANAHORIA NEGRA.	37
TABLA 7. MOLES EQUIVALENTES DE TROLOX OBTENIDOS UTILIZANDO EL EX	TRACTO DE ZANAHORIA PARA
LA REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO.	39
Tabla 8. VALORES OBTENIDOS DE COLOR EN LABHUECHROMA.	
Tabla 9. VALORES OBTENIDOS DE COLOR EN LABHUECHROMA.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zanahoria negra.	11
Figura 2. Estructura general de las antocianinas donde R1 y R2 pueden ser H o azúcares. R puede ser	
sustituido por H u OH	12
Figura 3. Estructuras moleculares de las principales antocianinas.	12
Figura 4. Estructura de la Banda I (300-400 nm) y Banda II (240-285 nm)	24
Figura 5. Perfil cromatográfico obtenido del extracto de zanahoria negra.	30
Figura 6. Espectro UV-Vis del extracto de zanahoria negra filtrado con 1μ.	32
Figura 7. Espectro UV-Vis con variaciones de pH 1-11	33
Figura 8. Efecto batocrómico de las antocianinas. Variación del pH 1-11	34
Figura 9.Espectro infrarrojo del polvo del extracto de la zanahoria negra.	34
Figura 10. Curva estándar de ácido gálico utilizada en la determinación de polifenoles totales por el	
método de Folin-Ciocalteu.	36
Figura 11. a) Solución de cobre antes de la titulación. b) precipitación de cobre después de la titulación.	c)
color rojizo de la solución debido a la precipitación del cobre.	38
Figura 12. Absorbancia del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con distintas concentraciones	
utilizando Trolox y el extracto de la zanahoria negra.	39
Figura 13. Voltamperometría cíclica del extracto de la zanahoria negra con concentraciones de 0.4, 1, 2 y	y 4
mM	42
Figura 14. Regresión lineal de la capacidad antioxidante electroquímica del Trolox.	44
Figura 15. a) Yogur con colorante rojo grosella. b) después de 25 días	45
Figura 16. a) Yogur con colorante de zanahoria negra con ácido cítrico. b) después de 25 días	46

1 Introducción

1.1 LA IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES

En las últimas seis décadas el campo de estudio de los antioxidantes ha experimentado un gran auge dentro de diversas áreas multidisciplinarias que engloban tanto los alimentos, así como la salud. Un número creciente de evidencias, de tipo epidemiológico y experimental indican que los antioxidantes presentes en diversos alimentos tienen un papel esencial para la salud.

Primeramente, debemos tomar la definición de un antioxidante. En términos generales, un antioxidante es una molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otra molécula. Los antioxidantes incluso en bajas concentraciones neutralizan la acción oxidante de diversas especies reactivas tales como radicales libres, óxidos y peróxidos generados principalmente a partir de diferentes reacciones de oxidación con el oxígeno (Halliwell, 2009).

Dentro del campo de la bioquímica, una oxidación es considerado como todo proceso en el que ocurre una pérdida de electrones, captación de oxígeno o una deshidrogenación, así como una reducción es aquel proceso en el que se aceptan electrones o se pierden oxígenos (Chang & College, 2002). Por lo tanto, una reacción de oxidación va siempre acompañada de una reducción y viceversa llamadas entonces reacciones de óxido-reducción (Voet & Voet, 2011).

Hoy en día, muchos tipos de antioxidantes son utilizados en la industria de alimentos para la conservación de estos. Sin embargo, actualmente su estudio está principalmente enfocado en sus efectos dentro del organismo, ya que naturalmente todas las especies tienen ciclos oxidativos y por lo tanto, antioxidantes que pueden prevenir este tipo de procesos. En consecuencia, estas reacciones de oxidación pueden desencadenar la producción de radicales libres que afecten al organismo. Un exceso de radicales libres de oxígeno (RLO), el cual se define como una molécula con al menos un electrón desapareado, es extremadamente reactivo y debido a esto, pueden romper el equilibro dentro del organismo, dando lugar al estrés oxidativo (Sies, 1985).

El uso de productos antioxidantes en el ámbito alimenticio se ha extendido por esta razón y las industrias alimenticias se han volcado en la búsqueda de compuestos sintéticos porque son más económicos que los naturales. Los dos más utilizados son el hidroxianisol butilado -o butilhidroxianisol (BHA)- y el hidroxitolueno butilado -o butilhidroxitolueno (BTH). Pero estudios recientes han puesto en tela de juicio su presunta inocuidad: los experimentos de laboratorio han

demostrado que en las ratas provocan tumores. Todos los antioxidantes tienen una estructura química común, consistente en un anillo aromático insaturado que contiene por lo menos un hidroxilo que funciona como donador de e⁻ o átomos de H. En la actualidad, la mayoría de los antioxidantes utilizados en la industria alimentaria en México son los artificiales (Cao, Hu, Zheng, Yang, & Lu, 2011).

Aunque en pequeñas dosis los antioxidantes sintéticos parezcan inocuos para el ser humano, se están buscando caminos alternativos y dirigiendo las investigaciones hacia los antioxidantes naturales, que seguramente son más eficaces y, por supuesto, más seguros para la salud. Los más conocidos y utilizados desde hace ya mucho tiempo son la vitamina C y la vitamina E, reproducidas químicamente en laboratorio (respectivamente como ácido ascórbico y tocoferol de síntesis). Pero se han individualizado otros antioxidantes naturales y se están llevando a cabo investigaciones para determinar su utilización en el ámbito de la industria alimenticia (Abu-Fayyad & Nazzal, 2017).

La mayoría de los antioxidantes naturales, están conformados por más de un anillo aromático con uno o más grupos -OH capaz de donar iones hidronio a la reacción de oxidación. La efectividad para inhibir los procesos de oxidación depende de la abundancia de los grupos -OH presentes en el anillo aromático. Al contrario, la mayoría de los antioxidantes sintéticos cuentan solamente con un anillo en su estructura. Por lo tanto, los compuestos obtenidos naturalmente son de especial interés debido a su baja o nula toxicidad para su uso en procesos alimenticios y aplicaciones en la salud (Brewer, 2011).

Las ventajas del uso de antioxidantes naturales, es la facilidad y disponibilidad con la que se cuenta al momento de querer extraerlos y su fácil estudio y aplicación en el campo de la salud debido a su biocompatibilidad. Aparte de ser moléculas que no ponen en riesgo a la persona que se encuentra manipulándolos.

Para fomentar la inhibición de estos procesos oxidativos, los antioxidantes de origen natural, derivados de plantas, cuentan con efectos benéficos en contra de las enfermedades neurodegenerativas inducidas por estrés oxidativo. Los compuestos fenólicos son el grupo de antioxidantes naturales más importante, debido a que tienen una alta actividad inhibidora de radicales libres (Brewer, 2011).

Debido a los múltiples problemas que se pueden desencadenar en consecuencia a las reacciones de óxido-reducción, se buscan constantemente nuevas implementaciones en el área farmacológica y de salud en general para la inhibición de radicales libres, utilizando productos naturales.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En este trabajo, se estudió la especie *Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.*, debido a su alto contenido de antocianinas. Específicamente en esta especie en muestras secas, se han contabilizado 154 mg equivalentes de cianidina 3-0-glucosídica por gramo (Akhtar et al., 2017). Por lo tanto, es considerada una buena opción de estudio para evaluar su capacidad antioxidante.

Recientemente la zanahoria negra ha sido de gran interés debido al incremento en la búsqueda de colorantes alimenticios provenientes de fuentes naturales. Esto por restricciones legales según la industria alimentaria, así como el rechazo hacia los aditivos alimenticios según los consumidores (Krummel, Seligson, & Guthrie, 1996)

El estudio de las propiedades electroquímicas del extracto ante agentes oxidantes podría establecer una buena pauta para el desarrollo de biomateriales aplicados a enfermedades crónicas que pudieran ser inducidas debido a la presencia de estrés oxidativo. Además, gracias a las propiedades pH responsivas de las antocianinas, pueden ser utilizadas en matrices poliméricas biodegradables para empaques inteligentes en la industria alimentaria.

1.3 Hipótesis

Debido al alto contenido de compuestos fenólicos que contiene la especie *Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.*, se espera que el método de extracción acuoso propuesto en este proyecto, dé como resultado la obtención de compuestos que presenten una alta capacidad antioxidante.

1.4 Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante del extracto acuoso obtenido de la especie *Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.,* mediante pruebas electroquímicas y colorimétricas para estudiar sus posibles bioaplicaciones.

1.5 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de trabajo y método de extracción óptimo para obtener la mayor concentración de antocianinas presentes en la especie Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.
- Determinar la cantidad de mg/L de antocianinas presentes según el método de extracción utilizado durante este proyecto.
- Realizar una identificación química del tipo de compuestos fenólicos contenidos en el extracto.
- Identificar las familias de compuestos fenólicos presentes en el extracto por medio de técnicas espectroscópicas y colorimétricas.
- Realizar pruebas de capacidad antioxidante del extracto y comparar estos resultados con el antioxidante Trolox.
- Comprobar en un modelo alimenticio de yogur la eficiencia como aditivo de color de las antocianinas obtenidas.

2 ANTECEDENTES

Anteriormente, los antioxidantes eran estudiados debido a sus propiedades para la conservación de alimentos con el propósito de evitar el daño oxidativo de la misma. Se han utilizado principalmente en alimentos que requieren de lapsos grandes de tiempo en almacenamiento. Estos procesos están todos relacionados con la peroxidación lipídica o por la acción de enzimas lipoxigenasas en las plantas (Cadenas, 2001).

Una clase de compuestos antioxidantes que contienen los alimentos derivados de las plantas, son los flavonoides y han sido identificados alrededor de 400 compuestos. Debido a su gran interés, se enfocaron primeramente en los alimentos que se consumían en Gran Bretaña y tuvieron mayor atracción por su potencial en beneficios a la salud (Andersen, Markham, & Cadenas, 2006).

Los flavonoides son uno de los grupos de metabolitos más importantes en las plantas debido a la cantidad de funciones que le aportan al organismo tales como desarrollo y crecimiento. Muchas de estas funciones son críticas para la supervivencia de la planta desde su polinización, así como la reabsorción de nutrientes provenientes de sus hojas en estado de senescencia.

De igual manera, los flavonoides son conocidos por la tolerancia que proveen a la planta ante factores de estrés tales como dar defensa contra organismos herbívoros o patógenos y de igual manera, aportan la base para las interacciones alelopáticas con otras plantas (Andersen et al., 2006).

Evidentemente los flavonoides son extremadamente útiles dentro del metabolismo de las plantas ya que influyen desde las que no presentan vascularización hasta los más complejos angiospermas.

Así mismo, un grupo derivado de los flavonoides, son las antocianinas, estos compuestos, presentes en la vacuola de las plantas son responsables de otorgar el color azul, púrpura y rojo a las flores y frutos de diversas plantas (Bridle & Timberlake, 1997). De igual manera, brindan protección a las plantas contra la radiación ultravioleta y proveen actividad antiviral y antimicrobiana (Wrolstad, 2004).

Las antocianinas han estado implicadas dentro del grupo de colorantes aposemáticos; es decir que estos colorantes son utilizados por las plantas como una estrategia anti predatoria donde una especie tóxica o de sabor desagradable advierte a otros depredadores de su mala calidad

mediante el uso de colores brillantes. Sin embargo, no está completamente comprobado que la defensa de los tejidos vegetales sea la única razón para la existencia de este tipo de colorantes (Lee & Gould, 2002).

Sin embargo, las antocianinas a diferencia de otros compuestos fenólicos no presentan toxicidad a especies animales mayores, incluso para los invertebrados. Es esta razón por la cual actualmente se encuentran en estudio sus bioaplicaciones.

De las antocianinas conocidas hasta el momento, las cuales se tienen registradas aproximadamente 20, las más comunes e importantes son la pelargonidina, la delfinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina. La combinación de estas con diversos azúcares generan aproximadamente 150 antocianinas (Garzón, 2008).

La especie *Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.* comúnmente llamada "zanahoria negra" es muy estudiada actualmente debido a su alto contenido de antocianinas (Akhtar et al., 2017). La zanahoria negra según su estudio es proveniente de Asia y fueron traídas y cultivadas en Europa por los holandeses. A pesar de que los cultivos de zanahoria negra se han difundido por varios países, los estudios especializados en esta planta han sido principalmente reportados en Alemania (Algarra et al., 2014).

La toxicidad de los colorantes sintéticos utilizados tanto en la industria de alimentos, productos farmacéuticos y cosmética se ha vuelto una creciente preocupación. Anteriormente, se han prohibido los colorantes rojo No. 2 y No. 40 en Austria, Japón, Noruega y Suecia debido a estudios realizados que afirman tener consecuencias neurológicas agudas relacionadas a la hiperactividad en niños de edad escolar entre 6 y 12 años (Krummel et al., 1996).

Tales antecedentes son indicios lo suficientemente buenos para disminuir la demanda de colorantes artificiales y promover el uso de colorantes naturales como las antocianinas. Las políticas regulatorias en cuanto al uso de colorantes derivados de las antocianinas varían de país a país (MacDougall, 2000).

2.1 HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ZANAHORIA NEGRA

La zanahoria negra es una hortaliza perteneciente a la familia de las apiaceas y desde hace aproximadamente 3000 años, se ha conocido la especie de la zanahoria negra la cual se descubrió y tuvo predominio en los países orientales tales como Turquía, Afganistán, Egipto, Pakistán y la India. La zanahoria negra es entonces proveniente de Asia y fueron traídas y cultivadas en Europa por los holandeses. A pesar de que los cultivos de zanahoria negra se han difundido por varios países, los estudios especializados en esta planta han sido principalmente reportados en Alemania (Algarra et al., 2014).

Debido a la variedad de colores que presentan distintas especies de zanahoria, fue necesaria una subdivisión que constó de dos grupos principales; la zanahoria oriental la cual contiene antocianinas (*Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens Alef.*) y la zanahoria occidental que contiene carotenos (*Daucus carota ssp. Sativus var. Sativus*) (Kammerer, Carle, & Schieber, 2004).

2.1.1 Clasificación taxonómica

En la **Tabla 1** se muestra la clasificación taxonómica de la zanahoria negra.

Taxonomía		
Reino	Plantae	
División	Magnoliophyta	
Clase	Magnoliopsida	
Orden	Apiales	
Familia	Apiaceae	
Subfamilia	Apioideae	
Tribu	Scandiceae	
Subtribu	Daucinae	
Género	Daucus	
Especie	Daucus carota	
Subespecie	Daucus carota ssp. Sativus	

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ZANAHORIA NEGRA.



Figura 1. Zanahoria negra.

2.1.2 Composición química de la zanahoria negra

Debido a las propiedades que presenta la zanahoria negra según su color, tiene un alto contenido de antocianinas.

Las antocianinas constituyen el grupo más grande de flavonoides responsables por otorgar colores desde el rosa salmón, rojo, violeta y hasta azul marino en la mayoría de las flores, frutos y hojas de los angiospermas, así como también determinadas veces se encuentran también dentro de las raíces y tubérculos (Algarra et al., 2014).

Molecularmente, las antocianinas consisten de una anglicona (antocianidina), azúcares y en muchos casos, grupos acilos. (Figura 2) Las antocianidinas son derivados de 2-fenil benzopirilio (ion/catión flavilio). Cuando una determinada molécula de antocianina es disuelta en agua, una serie de estructuras secundarias son formadas a partir del catión flavilio de acuerdo a distintas reacciones ácido-base, hidratación o tautomerismo (Andersen et al., 2006).

Figura 2. Estructura general de las antocianinas donde R1 y R2 pueden ser H o azúcares. R puede ser sustituido por H u OH.

El total de antocianinas reportadas aisladas de plantas son 539. Sin embargo, a lo largo de la investigación de estos compuestos, se han identificado 31 antocianinas monoméricas de las cuales el 90% de ellas están basadas en 6 de ellas según su estructura. (Andersen et al., 2006) Estas seis antocianinas son las siguientes: pelargonidina (Pg), cianidina (Cy), peonidina (Pn), delfinidina (Dp), petunidina (Pt) y malvidina (Mv). (Figura 3) De las antocianinas identificadas, el 97% de ellas son glucosiladas. La 3-desoxyantocianidina, sphagnorubina y rosacianina B son las únicas antocianidinas encontradas en formas no glucosiladas en plantas (Fukui, Kusumi, Masuda, Iwashita, & Nomoto, 2002).

Figura 3. Estructuras moleculares de las principales antocianinas.

3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

3.1 DEFINICIÓN DE ANTIOXIDANTE

Químicamente, un antioxidante es una molécula con la capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otra molécula. Es decir, se realiza una transferencia de electrones a las moléculas propensas a sufrir reacciones de oxidación. Debido a esto, es la razón de que los antioxidantes sean a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles (Cadenas, 2001).

Según sea el origen y el método de producción, los antioxidantes pueden dividirse en naturales o sintéticos.

3.2 ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL

Según el diccionario colaborativo de inglés internacional, un "producto natural" está definido como "una sustancia química producida por un organismo vivo; un término comúnmente utilizado haciendo referencia a sustancias químicas que se encuentran en la naturaleza y tienen distintos efectos farmacológicos."

Internacionalmente, no existe ninguna definición concreta de "antioxidante natural" dentro de la industria de alimentos. Esto es debido a que el término "natural" es aplicado a un grande grupo de saborizantes los cuales son clasificados como naturales, idénticamente naturales o artificiales. En un intento de clasificar de la misma manera a los antioxidantes naturales, estos podrían ser definidos como "sustancias o compuestos que poseen varios tipos de propiedades antioxidantes y que son producidos en organismos vivos mediante diversos caminos bioquímicos, y que pueden ser formados a lo largo de toda la cadena alimenticia; desde el origen de una planta hasta el origen animal. También pueden ser obtenidos biológicamente de materiales en bulto mediante procesos físicos, microbiológicos o enzimáticos." (Ba et al., 2012).

3.2.1 Clasificación de antioxidantes naturales

Teniendo como perspectiva una visión farmacológica, los antioxidantes primeramente son clasificados como enzimáticos y no enzimáticos; tales como los minerales, vitaminas, carotenos, antioxidantes de bajo peso molecular, y polifenoles. (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, & Kumar, 2006). Sin importar el origen o la naturaleza química de estos compuestos, los antioxidantes naturales la mayoría de las veces han sido asociados con metabolitos secundarios de plantas, tales como las vitaminas C y E es decir, ácido ascórbico y tocoferol; así como otros fitoquímicos de plantas como ácidos fenólicos, terpenoides, flavonoides etc.

Según el mecanismo de acción, los antioxidantes naturales pueden ser i) compuestos que rompen la cadena principal; (ii) secundarios o preventivos: enzimáticos, quelantes, adsorbentes de oxígeno; y (iii) multifuncionales: dependiendo del medio oxidante, pueden actuar como antioxidantes primarios y/o secundarios.

También según el origen y mecanismo de formación, es conveniente clasificar los antioxidantes naturales en compuestos que son (i) biosintetizados y acumulados en materiales cuyo origen son alimentos basados en plantas, (ii) materiales agricultores de origen animal, (iii) fuentes marinas, (iv) producidos por microorganismos, y (v) obtenidos durante procesos de la agricultura, tales como la fermentación y calentamiento.

Según sus propiedades físicas, los antioxidantes naturales pueden ser solubles en agua o solubles en lípidos y ambos poseen en sus estructuras, una parte hidrofílica, así como una lipofílica. Los antioxidantes naturales pueden poseer diversos colores (antocianinas), así como también ser incoloros. Pueden diferir también en sabores y olores los cuales cumplen un papel muy importante en la industria de alimentos (Ba et al., 2012). En la **Tabla 2**, se muestran diversos compuestos antioxidantes naturales y un resumen según la función que cumplen.

Antioxidantes		Funciones	
Enzimas: catalasa, bismutasa	superoxida,	Bismutasa cataliza la transformación del radical	
peroxidasa		superóxido en peróxido de hidrógeno; catalasa	
		transforma peróxido de hidrógeno en agua y	
		oxígeno molecular; peroxidasa reduce lípidos	
		peróxidos en ácidos grasos hidroxilos estables.	

	(5)
	(Presente en muchos alimentos) (Pravst,
	Žmitek, & Žmitek, 2010).
Proteínas	Pueden actuar como antioxidantes primarios o
	secundarios; presentes en varios alimentos de
	fuente animal o vegetal. Por ejemplo, la papa
	(Elias, Kellerby, & Decker, 2008).
Péptidos	Pueden actuar como antioxidantes primarios o
	secundarios, se forman durante la
	fermentación producida por hidrólisis
	enzimática con proteinasas; algunos ejemplos
	son carnosina y anserina presentes en los
	músculos (Elias et al., 2008).
Aminoácidos	Pueden actuar como antioxidantes primarios o
	secundarios; presentes en pequeñas
	cantidades en fuentes de origen animal o
	vegetal. Se forman durante la fermentación,
	por ejemplo, la histidina, uno de los mejores
	antioxidantes entre los aminoácidos.
Vitaminas C, E, A	Funcionan como inhibidores de radicales,
	agentes quelantes, solubles en lípidos:
	tocoferol, tocotrienol y retinol; solubles en
	agua: ácido ascórbico y ácido dehisroascórbico
	(Núñez-Córdoba & Martínez-González, 2011).
Antocianinas (pigmentos vegetales)	Funcionan como inhibidores de radicales;
	algunos ejemplos son las antocianidinas:
	cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina,
	peonidina, sus antocianinas glucosiladas.
	Presentes en algunas plantas vegetales
	(Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-
	Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009).
Flavonoides, derivados y constituyentes	Inhibidores de radicales libres; pueden actuar
oligoméricos.	como antioxidantes secundarios. Presentes en

	varias fuentes vegetales como frutas,	
	zarzamoras, fresas (Es-Safi, Ghidouche, &	
	Ducrot, 2007).	
Flavones	· · · · ·	
riavones	Algunos ejemplos son apigenina, luteolina,	
	tangeritina.	
Flavonoles	Algunos ejemplos son quercetina, miricetina,	
	kaempferol.	
Flavonones	Algunos ejemplos son hesperitina, naringenina,	
	eriodictol.	
Carotenoides: carotenos (hidrocarbonos) y	Donadores de electrones, pueden reaccionar	
xantofilos (compuestos oxigenados)	con especies reactivas de oxígeno (ROS) debido	
	a sus dobles enlaces conjugados y grupos	
	hidroxilos en los xantofilos; algunos ejemplos	
	son los B-carotenos, licopeno; luteína,	
	astaxantina; presente en fuentes vegetales y	
	huevos (Kiokias & Gordon, 2004).	
Betalaínas	Pigmentos rojos y amarillos; incluyen	
	pigmentos antioxidantes fuertes tales como los	
	que se encuentran en la remolacha (betanina)	
-	(Azeredo, 2009).	
Escualeno	Antioxidante con seis dobles enlaces; presente	
	en el aceite del hígado del tiburón, semilla de	
	amaranto y olivos (Harnedy & FitzGerald,	
	2012).	
Ácido cítrico, ácido oxálico	Agentes quelantes, antioxidantes sinérgicos.	
	Presentes en varias frutas y vegetales.	

TABLA 2. ANTIOXIDANTES NATURALES Y SUS FUNCIONES.

Las estructuras de los antioxidantes naturales pueden tener muchas formas químicas. Pueden estar presentes como macromoléculas (biopolímeros de plantas o animales: proteínas, polisacáridos, glicoproteínas, proteínas fosforiladas, etc.); así como moléculas de tamaño intermedio como oligómeros (péptidos, oligosacáridos, proantocianidinas, taninas, lignanos); de tamaño pequeño, no poliméricas como los aminoácidos, ácidos fenólicos, flavonoides,

terpenoides, tioles, carotenoides, etc) y como moléculas complejas tales como los ésteres de carbohidratos, glicósidos así como su unión para para formar paredes celulares (Ba et al., 2012).

3.3 Propiedades de los antioxidantes

Según la estructura física de los antioxidantes ya sea hidrofílico o lipofílico, pueden presentar ciertas interacciones con la membrana celular. Por ejemplo, el escualeno al internalizarse en el organismo forma parte del metabolismo del colesterol en animales debido a que es el precursor del lanosterol. El escualeno se introduce en la membrana celular donde cumple un rol fundamental para mantener un gradiente electroquímico el cual se encarga del transporte de iones a través de la misma membrana. Gracias a la presencia del escualeno, se presenta un aumento de polaridad, así como las interacciones hidrofóbicas dentro de la membrana haciendo más fácil la regulación de proteínas que entran y salen a través de ésta. (José & Alcántara, 2018)

4 IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

4.1 DEFINICIÓN DE RADICAL LIBRE

Un radical libre es aquella especie química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, además por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial (Sellés, 2011).

4.2 ESTRÉS OXIDATIVO EN CÁNCER

Un radical libre puede afectar hasta un millón de moléculas durante la reacción en cadena (8). Y estos compuestos en cuestión forman parte de las llamadas especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxigen Species) (Sellés, 2011)

Los radicales libres se liberan durante el metabolismo humano, así como también se pueden producir debido a contaminantes atmosféricos, acuáticos o de suelos, por radiación ultravioleta y gamma, entre otros. Su producción está también relacionada con el consumo de drogas, tabaco y alcohol, exposición a pesticidas y fertilizantes, incluso por una mala alimentación.

El término de estrés oxidativo se asocia a las células y a la acción de un radical libre que puede afectarla (Reyes Munguía, Galicia Cardoso, & Luisa, 2011), de esta manera cuando se tiene un equilibrio entre las reacciones antioxidantes y especies reactivas (endógeno y exógeno) se tienen condiciones normales. Este equilibrio da pie que el daño celular debido a oxidaciones sea muy pequeño. Sin embargo, cuando se rompe dicho equilibrio se puede contraer un déficit en el sistema antioxidante o bien la proliferación descontrolada de radicales libres (Quintanar Escorza & Calderón Salinas, 2009).

El oxígeno molecular no es reactivo, pero sí sus derivados, las ERO. Estos derivados se forman durante el metabolismo aeróbico y son capaces de interactuar con moléculas presentes en la misma célula que se ve afectada, causando oxidaciones y al mismo tiempo induciendo daños y mutaciones en el ADN, inactivación de proteínas, así como muerte celular.

Dentro de la célula, la mitocondria es la principal responsable de la producción de ERO debido a la reducción del oxígeno por un electrón, una reacción química en la cadena de respiración de la mitocondria. Por lo tanto, la probabilidad de que el oxígeno molecular se reduzca a superóxido en vez de agua se ve incrementada si la concentración de protones de la membrana interna es alta y el flujo de electrones de la cadena de respiración es menor.

Durante el proceso de carcinogénesis, las ERO cumplen un papel de relación muy importante con el ADN. El daño oxidativo que se le puede causar abarca desde la oxidación específica de bases purinas o pirimidinas hasta presentar rupturas en la hebra de ADN. Las ERO son capaces de reaccionar con las bases de nucleótidos, haciendo cambios en su estructura causando alteraciones mutagénicas, la cual es la principal razón por las que se promueve el cambio de una célula normal a una tumoral. Todo esto dependerá del tipo de ERO que se presente oxidando a la célula, su rango de producción y la habilidad que tenga la célula para proteger o reparar el ADN dañado (José & Alcántara, 2018)

Estas especies reactivas también pueden presentar oxidación en proteínas y lípidos celulares. Normalmente estas interacciones causan la pérdida de la función proteica. La peroxidación lipídica es una forma de daño oxidativo que toma lugar en las membranas celulares cuando ocurren reacciones grandes de ácido grasos con niveles altos de ERO, causando radicales de ácidos grasos e hidroperóxidos lipídicos. Estos hidroperóxidos lipídicos causan alteraciones reversibles en la estructura de la membrana y la funcionalidad, además de producir aldehídos reactivos que pueden ocasionar acciones mutagénicas, genotóxicas y citotóxicas. Estas alteraciones pueden prevenirse con enzimas celulares antioxidantes así como antioxidantes que intervengan para inhibir estos radicales libres como la vitamina C, ubiquinonas, β-caroteno, etc (Lopaczynski & Zeisel, 2001)

Hay estudios que relacionan la apoptosis con una peroxidación lipídica de la membrana. La oxidación convierte los aldehídos en moléculas muy reactivas capaces de inducir una apoptosis o incluso necrosis en distintos tipos celulares. Aunque también existen antioxidantes para detener la peroxidación lipídica, no pueden parar la apoptosis. Seguramente la acción de los antioxidantes capaces de detener la apoptosis dependerá en gran medida la dosis y tiempo de exposición utilizados.

5 Materiales

A continuación, se enlistan los solventes, reactivos y materiales utilizados durante este proyecto.

Solventes y reactivos	Materiales
Agua tridestilada	Zanahoria negra
Ácido cítrico	Parrilla de calentamiento
Ácido acético	Probeta de 100 y 10 mL
Agua grado HPLC	Vasos de precipitado de 10, 50 y 100 mL
Acetonitrilo	Tela de manta
Ácido gálico	Papel filtro de 1μ
Reactivo Folín-Ciocalteu	Celda electroquímica
Carbonato de sodio	pHmetro
Reactivos de Fehling A y B	Caja petri
Solución de glucosa 1%	Termómetro
Azul de metileno	Bureta 100 mL
Solución de DPPH	Matraz de fondo plano
Trolox	Soporte universal
Cloruro de cobre	Pipeta 1, 10 mL
Neucoproína	Espátula
Etanol	
Acetato de amonio	
Hidróxido de sodio	
Ácido clorhídrico	

6 METODOLOGÍA

6.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

La extracción de los compuestos fenólicos que contiene la zanahoria negra se realizó utilizando la siguiente metodología:

En una parrilla de calentamiento, se colocaron 100 mL de agua tridestilada a 90°C hasta que alcanzó el punto de ebullición. Se pesaron 10 g de zanahoria negra en cuadros pequeños para favorecer la extracción de compuestos en toda la estructura de la planta.

Se añadieron los 10 g de zanahoria negra en los 100 mL de agua tridestilada. En agitación a 6,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 90°C. Finalmente, filtrar la mezcla obtenida con papel filtro de 1 micra.

6.2 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EL MÉTODO DE PH DIFERENCIAL

La metodología de cuantificación se realizó mediante espectroscopía UV-Visible. (Mónica Giusti & Wrolstad, 2005)

El método diferencial de pH está dado por la ecuación 1:

$$P_{am} = \frac{(A)(MW)(FD)(1,000)}{E},$$
 Ecuación (1)

dónde:

A= $(A_{\lambda vis\text{-max}} - A_{700})_{pH1}$ - $(A_{\lambda vis\text{-max}} - A_{700})_{pH4.5}$, representa las absorbancias del espectro de UV del extracto.

MW=Peso molecular de la antocianina.

FD=Factor de dilución

E=Absortividad molar

6.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar los componentes individuales de una muestra. Esta separación se produce mediante las interacciones químicas o físicas de la muestra con las fases móvil y estacionaria. Debido a que existen muchas combinaciones de fases móvil/estacionaria que se pueden emplear cuando se separa una mezcla, hay varios tipos diferentes de cromatografías que se clasifican según los estados físicos de esas fases. La cromatografía en columna líquido-sólido, la técnica de cromatografía más popular incluye una fase móvil líquida que filtra lentamente a través de la fase estacionaria sólida, lo que lleva los componentes separados.

Depende de bombas para pasar un solvente líquido presurizado que contenga la mezcla de muestra a través de una columna llena de un material adsorbente sólido. Cada componente de la muestra interactúa de una manera diferente con el material adsorbente, lo cual genera distintas velocidades de transporte para los distintos componentes, provocando la separación de los componentes a medida que salen de la columna. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención.

El uso de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. ("Sistemas de cromatografía líquida," n.d.)

Una mejora en la técnica de HPLC fue la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Por ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos. ("HPLC - Asegurando la calidad en el producto," n.d.)

A continuación se muestran las condiciones utilizadas para llevar a cabo la caracterización por cromatografía y en la **Tabla 3** el programa de gradiente utilizado (Kammerer et al., 2004).

Se utilizó como eluyente A: 2% (V/V) de ácido acético en agua grado HPLC y como eluyente B: 0.5% de ácido acético en agua grado HPLC y acetonitrilo (50/50) (V/V) con un flujo de 0.4 mL/min a una temperatura de 25°C.

Eluyente B	Tiempo (minutos)	Eluyente A
10% - 18%	20	90% - 82%
18% - 30%	20	82% - 70%
30% - 40%	5	70% - 60%
40% - isocrática	5	60% isocrática
40% - 58%	20	60% - 42%
58% - 70%	3	42% - 30%
70% - 100%	2	30% - 0%
100% isocrática	8	0%
100% - 10%	2	90%

TABLA 3. CONDICIONES DEL PROGRAMA DE GRADIENTE UTILIZADO DURANTE LA CROMATOGRAFÍA HPLC.

Se tomaron 10 μ L de muestra del extracto obtenido y se colocaron en el equipo para su posterior análisis.

6.4 ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE

Debido a su estructura química, los flavonoides presentan absorciones características en la región del espectro UV-visible. Estas absorciones presentan corrimientos por el cambio del pH, en presencia de metales o la presencia o cambio de sustituyentes.

En un medio de etanol, todos los flavonoides muestran una absorción de intensidad fuerte-media en la región de 200-270 nm (Banda II) y conforme aumenta la longitud de onda, aparecen bandas de mayor intensidad entre 300-400 nm (Banda I). Esto se puede explicar debido a la estructura de los flavonoides. (Figura 4)

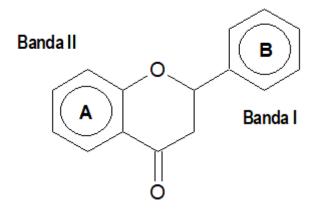


Figura 4. Estructura de la Banda I (300-400 nm) y Banda II (240-285 nm).

En dado caso que los anillos A y B se encuentren oxigenados, la intensidad de la Banda I es mayor que la intensidad de la Banda II. Esta oxigenación es la que da lugar al desplazamiento batocrómico correspondiente. En el caso de las antocianidinas, exhiben la Banda I en la región de los 465-550 nm y la Banda II de los 270-280 nm (Grisel & Georgina, 2007).

6.5 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo son producto de las transiciones energéticas de las moléculas de los estados vibracionales y rotacionales en otros. Para absorber radiación infrarroja, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar cuando vibra o gira. Sólo en estas circunstancias el campo eléctrico alternante de la radiación puede interaccionar con la molécula y modificar la amplitud de alguno de sus movimientos. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga y por la distancia entre los dos centros de carga. La radiación infrarroja no tiene la energía necesaria para producir las transiciones electrónicas que produce la espectroscopia ultravioleta o visible; es debido a esto que la espectroscopia infrarroja se limita a especies moleculares para las cuales la diferencia de energía entre los distintos estados de vibración o rotación es muy pequeña. (Skoog & Crouch, n.d.)

6.6 POLIFENOLES TOTALES: MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Para la identificación de polifenoles totales se llevó a cabo la siguiente metodología (Jurado Teixeira et al., 2016).

1

Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo intervalo de concentración fue de 10-50 mg/mL.

Los extractos de la muestra vegetal se evaluaron tomando 1 mL.



Se diluyó 1 mL de la muestra 1:100 en agua destilada.

Se añadieron 5 mL de la solución de Folin-Ciocalteu (10% en agua tridestilada) y se dejó reposar durante 5 minutos.

Se añadieron 4 mL de Na₂CO₃ al 7.5%



Se agitó y se protegió la solución de la luz y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

El contenido de compuestos fenólicos se expresó como mg de ácido gálico/g de extracto.

6.7 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

Para la cuantificación de azúcares totales en el extracto se preparó la solución de Fehling A, la cual consistió en una disolución de CuSO₄ donde se mezclaron 7 g de CuSO₄ pentahidratado en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, se preparó la solución Fehling B compuesta por 35 g de tartarato sódico potásico y se le añadieron 10 g de hidróxido de sodio donde ambos reactivos se diluyeron en 100 mL de agua destilada.

Para realizar la medición estándar de glucosa se preparó una solución 1:100 en agua destilada.

En un matraz aforado de 250 mL, se añadieron 10 mL de Fehling A, y posteriormente se virtieron 10 mL de Fehling B. Se agregaron 30 mL de agua destilada y se colocó el matraz en una parrilla de calentamiento hasta alcanzar una temperatura entre 70° y 80°C.

Se colocó primeramente una solución de glucosa al 1% en una bureta y se realizó la titulación.

Se observó un tenue cambio de color a rojo-grisáceo. Cuando sucedió esto, se añadió al matraz una gota de azul de metileno al 1%. La titulación se detuvo cuando se observó la precipitación del cobre y se cuantificaron los mL necesarios de glucosa.

Una vez obtenida la cantidad de glucosa necesaria para precipitar el cobre, se repitió el experimento, pero colocando el extracto obtenido de la planta en la bureta.

6.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL RADICAL DPPH

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales (Halvorsen & Blomhoff, 2011; Ozgen, Reese, Tulio, Scheerens, & Miller, 2006), pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH (Goupy, Dufour, Loonis, & Dangles, 2003; Villaño, Fernández-Pachón, Moyá, Troncoso, & García-Parrilla, 2007).

Este radical es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.

Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Esta reacción entre el DPPH y un agente antioxidante puede representarse de la siguiente manera:

$$[DPPH *] + [AOH] \rightarrow [DPPH - H] + [AO *]$$

El radical DPPH cuando se encuentra con su electrón de valencia desapareado, presenta un color morado en solución y cambia a un amarillo pálido cuando es neutralizado. De esta manera, mediante un espectrómetro UV-Vis, podemos medir la absorbancia en 520 nm donde el DPPH naturalmente presenta una banda máxima de absorción y conforme se torna amarillo, esta absorbancia se ve disminuida.

Se evaluó la actividad antioxidante por el método de DPPH según la siguiente metodología (Brand-Williams et al., 1995).

Se realizó una curva estándar de Trolox con las concentraciones de 0, 200, 400, 600 y 800 μ M utilizando una solución 50 μ M de DPPH. Posteriormente, se utilizó el extracto como agente antioxidante del cual se tomaron 150 μ L disueltos en 2,850 μ L de la solución de DPPH. Se dejó reposar la solución durante 30 minutos y posteriormente se midió la absorbancia del DPPH en un espectrómetro de ultravioleta visible en los 516 nm.

El proceso químico que ocurre en la determinación por el método CUPRAC *(Cupric Reducing Antioxidant Capacity)* involucra los iones de Cu(II), Neucoproína (Nc) y moléculas de antioxidante (AO) y se puede representar como:

$$n Cu[(Nc)_2]^{+2} + mAO_{red} \leftrightarrow n Cu[(Nc)_2]^+ + m AO_{ox}$$

Con base en la ecuación anterior, la cuantificación de antioxidantes se lleva a cabo mediante la cuantificación de la variación en la cantidad del complejo $Cu[(Nc)_2]^+$ producido, misma que se incrementa gradualmente al aumentar la cantidad de antioxidante presente en la disolución (Apak, Güçlü, Özyürek, & Karademir, 2004). El AO_{red} es oxidado por el Cu(II) y se genera el complejo colorido amarillo-naranja $Cu[(Nc)_2]^+$.

Para medir la capacidad electroquímica del extracto, se siguió la siguiente metodología (Apak et al., 2004; Cárdenas, Gómez, & Frontana, 2014).

Para obtener la capacidad antioxidante vía electroquímica, se preparó una solución de cloruro de cobre 3x10⁻³ M en agua destilada, así como una solución de Neucoproína 6x10⁻³ M en etanol. Para controlar el pH de la solución, se añadió un buffer de acetato de amonio 1.2 M (pH=7). El pH se ajustó añadiendo HCl 1.2 M y NaOH 1.2 M. Para el procedimiento, se añadió en un vaso de precipitado 2 mL de cloruro de cobre, seguido de 2 mL del reactivo de Neucoproína. Se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 2 mL de buffer, 2 mL del extracto de zanahoria negra y 2 mL de agua destilada para alcanzar un volumen total de 10 mL. Se esperó a que la reacción en el potenciostato llegara al equilibrio y se realizó la medición (Reyes Pineda & Hernándeza, 2016).

Las pruebas electroquímicas se llevaron a cabo en una celda electroquímica donde se utilizó un electrodo de referencia Calomel Hg/Hg₂Cl₂ (saturado con KCl). Se empleó una barra de grafito como contra electrodo y una barra de carbono como electrodo de trabajo. Anterior a las mediciones, se pulió el electrodo de trabajo con polvo de alúmina seguido de un baño ultrasónico de 10 minutos. Este proceso se hizo por triplicado. Los voltamperogramas se obtuvieron utilizando un potenciostato Biologic VP-50 con una velocidad de barrido de 100 mV s⁻¹.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 MÉTODO DE PH DIFERENCIAL

Realizando el método de pH diferencial al extracto obtenido, filtrado con papel de 1μ , se obtuvo el siguiente resultado:

$$A = (0.053153 + 0.004723) - (0.058025 - 0.011093)$$
$$A = 0.010944$$

Realizando el cálculo de antocianinas monoméricas:

$$P_{am} = \frac{(0.010944)(445.2\frac{g}{mol})(14)(1000)}{26900\frac{mol}{L}}$$

$$P_{am=2.535753\frac{mg}{L}}$$

7.2 Perfil cromatográfico de los compuestos extraídos de la zanahoria negra

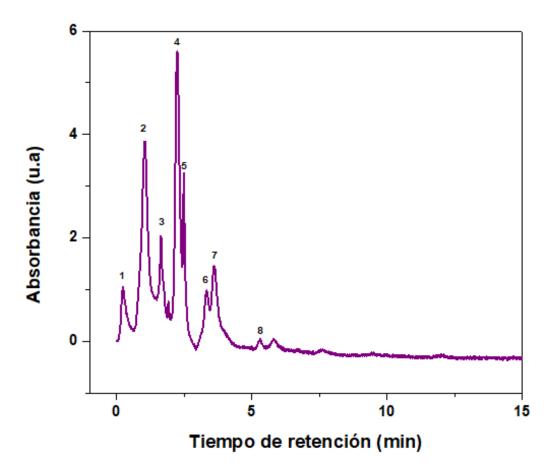


Figura 5. Perfil cromatográfico obtenido del extracto de zanahoria negra.

Pico	Tiempo de retención (min)	Antocianina
1	0.23	Cianidina 3-xiloglucanogalactosido
2	1.02	Cianidina 3-xilogalactosido
3	1.64	Ácido sinapinico derivado de cianidina 3-
		xiloglucanogalactosido
4	2.22	Ácido ferúlico derivado de cianidina 3-
		xiloglucanogalactosido
5	2.48	Ácido p-cumarico derivado de cianidina 3-
		xiloglucanogalactosido
6	3.31	Peonidina 3-xiloglucanogalactosido

7	3.63	Ácido ferúlico derivado de pelargonidina 3-
		xiloglucanogalactosido
8	5.29	Ácido ferúlico derivado de peonidina 3-
		xiloglucanogalactosido

TABLA 4. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL EXTRACTO DE ZANAHORIA NEGRA MEDIANTE HPLC.

Se llevó a cabo el perfil cromatográfico del extracto de zanahoria negra, los cuales se muestran en la **Tabla 4** y **Figura 5**. Según la comparación con lo reportado en la literatura, se comprobó la presencia de la cianidina 3-0-glucosídica, así como los derivados de esta en el extracto. El pico que presentó mayor absorción, correspondió a la molécula de ácido ferúlico derivado de la cianidina 3-xiloglucanogalactosido la cual representa aproximadamente el 80% del contenido total de antocianinas y el 40% en la pulpa de la zanahoria negra (Algarra et al., 2014)

7.3 ESPECTROSCOPÍA UV-VISIBLE

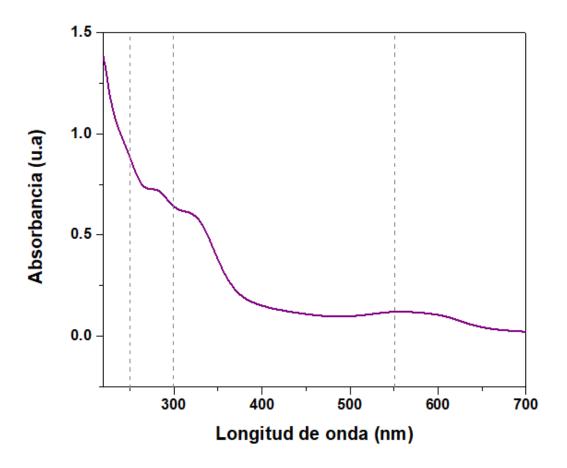


Figura 6. Espectro UV-Vis del extracto de zanahoria negra filtrado con 1µ.

En la **Figura 6** se muestra el espectro UV-Vis obtenido del extracto de la zanahoria negra en un medio acuoso. Las bandas más significativas se encontraron alrededor de los 250-300 nm y 550 nm. Según lo reportado en la literatura, podemos confirmar la presencia de las Bandas II y I respectivamente presentes en la estructura de los flavonoides.

7.4 Análisis de comportamiento en ph

El pH tiene un efecto en la estructura y estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto de protección sobre la molécula. En soluciones acuosas un pH < 2, el pigmento se encuentra en su forma más estable de catión flavilio presentando un color rojo intenso. Sin embargo, a valores más altos de pH, se pierde el protón y se adiciona agua, es decir la molécula se oxigena dando lugar al efecto batocrómico. Dicho esto, teniendo pH > 7, se presentan las formas oxidadas de la molécula, que se degradan rápidamente con el aire teniendo un color verde muy oscuro. En la **Figura 7** podemos ver la degradación de las antocianinas mediante la disminución de la absorción en la Banda I (500-550 nm) y su corrimiento hacia mayores longitudes de onda conforme se aumentó el pH de 1 hasta 11. En la **Figura 8** se muestra el cambio de color a partir de un pH 1 a 11 de izquierda a derecha. Se observó un color rojo intenso en condiciones ácidas, un color violeta en condiciones neutras y un color verde azulado oscuro en condiciones alcalinas.

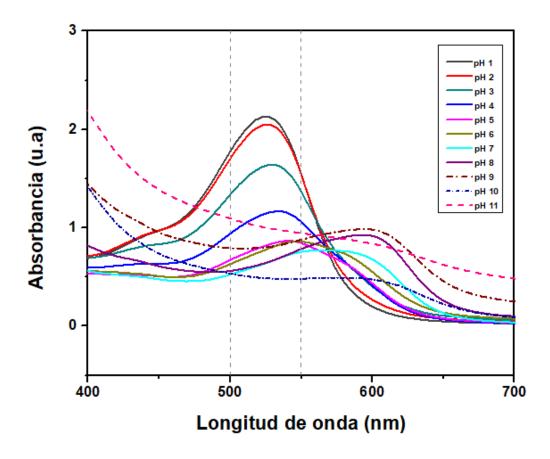


Figura 7. Espectro UV-Vis con variaciones de pH 1-11.



Figura 8. Efecto batocrómico de las antocianinas. Variación del pH 1-11.

7.5 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

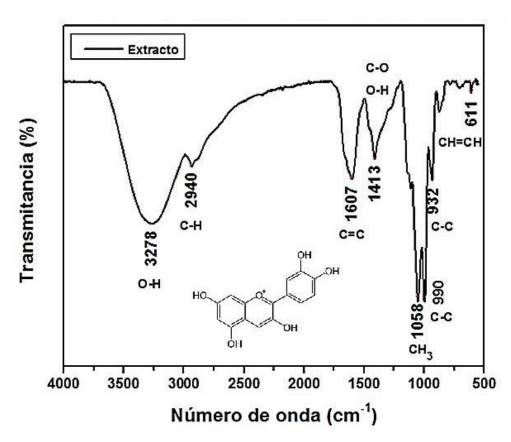


Figura 9. Espectro infrarrojo del polvo del extracto de la zanahoria negra.

En la **Figura 9**, se muestra el espectro infrarrojo, se observan las bandas de estiramiento asimétrico de O-H en 3278 cm⁻¹, estiramiento asimétrico C-H en 2940 cm⁻¹, estiramiento C=C en 1607 cm⁻¹, en los 1413 cm⁻¹ se presenta una combinación de dos bandas debido a vibraciones de

deformación de O-H y estiramiento de C-O, vibración oscilante de CH₃ en 1058 cm⁻¹, y vibraciones de la cadena molecular de C-C en 990 cm⁻¹ y 932 cm⁻¹ y CH=CH en 611 cm⁻¹.

En el espectro se observa que la banda de O-H es característicamente más grande que otras bandas presentes. Por lo tanto, a pesar de que este estudio se realizó con una cantidad de muestra del extracto previamente seco, existe una abundante presencia de grupos fenoles lo que podemos atribuir a que el extracto tenga una buena capacidad antioxidante.

Por otro lado, se encontraron las bandas esperadas según la estructura molecular de las antocianinas.

7.6 POLIFENOLES TOTALES: MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

Haciendo un ajuste lineal en la curva estándar de ácido gálico (R² = 0.9992) la cual se muestra en la **Figura 10**, se obtuvo la cantidad de polifenoles totales equivalentes en ácido gálico presentes en el extracto de la zanahoria negra, utilizando la ecuación de la recta mostrado en la **Tabla 5**.

y = mx + b

Muestra

Polifenoles totales (mg/L) eq de ácido gálico

Extracto de zanahoria negra

0.924864

TABLA 5. CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES EXPRESADO EN MG/L EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO.

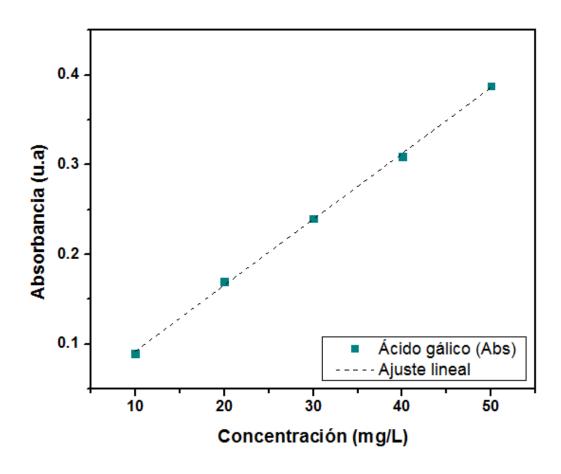


Figura 10. Curva estándar de ácido gálico utilizada en la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

7.7 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

Se cuantificó el volumen necesario de glucosa para realizar la reducción del cobre utilizado durante el procedimiento. El experimento se realizó por triplicado y posteriormente se realizó la misma cuantificación con el extracto de zanahoria negra. Los promedios obtenidos se muestran en la **Tabla 6**.

Glucosa (mL)	Extracto de zanahoria negra (mL)
14.5	10.2
9.5	10.7
10.5	14.7
Promedio: 11.5	Promedio: 11.86

TABLA 6. PROMEDIO DE VOLUMEN OBTENIDO PARA LA REDUCCIÓN DE COBRE UTILIZANDO GLUCOSA, ASÍ COMO EL EXTRACTO DE ZANAHORIA NEGRA.

Obteniendo los gramos de glucosa necesarios para reducir el cobre de la solución:

$$1 g \frac{1 ml}{100 ml} = 0.01 g Glucosa$$

$$11.5 \ ml \ (0.01 \ g) = 0.115 \ gr \ Glucosa$$

Posteriormente, obtenemos los gramos equivalentes de glucosa necesarios para reducir el cobre de la solución, utilizando el extracto de zanahoria negra:

$$(11.86 \ g) \left(\frac{0.115 \ g}{11.5 \ ml} \right) = \mathbf{0.1186} \ g \ eq. \ de \ glucosa$$

La diferencia en gramos calculada según lo necesario para la reducción del cobre es de 0.0036 g, por lo que este estudio nos permite concluir que el extracto presenta bastante abundancia de azúcares.

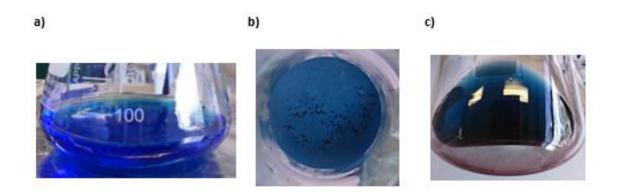


Figura 11. a) Solución de cobre antes de la titulación. b) precipitación de cobre después de la titulación. c) color rojizo de la solución debido a la precipitación del cobre.

7.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL RADICAL DPPH

En la **Figura 12** se muestra la absorbancia del radical DPPH utilizando como agentes antioxidantes el reactivo Trolox y el extracto de zanahoria negra. Podemos observar que conforme aumentamos la concentración del agente antioxidante, la absorbancia del DPPH tiende a disminuir.

Realizando un ajuste lineal de la curva estándar de Trolox (R^2 = 0.9467), se calcularon los moles equivalentes de Trolox utilizando el extracto en concentraciones de 200, 400 y 600 μ M. En la **Tabla 7** se muestran las cantidades obtenidas.

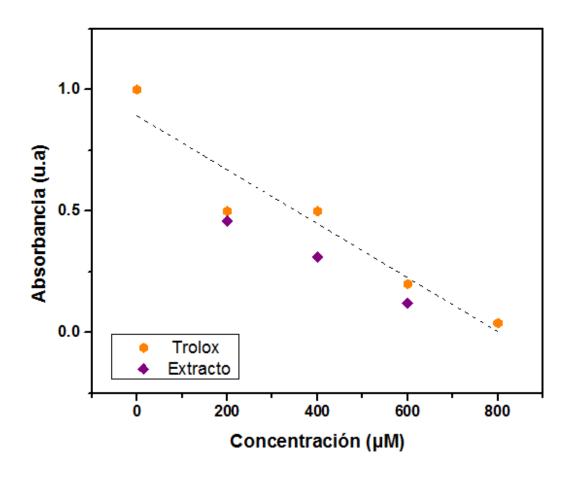


Figura 12. Absorbancia del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con distintas concentraciones utilizando Trolox y el extracto de la zanahoria negra.

Concentración (μM)				
μ moles equivalentes	200	400	600	
Trolox	0.891489	0.891667	0.8918668	

TABLA 7. MOLES EQUIVALENTES DE TROLOX OBTENIDOS UTILIZANDO EL EXTRACTO DE ZANAHORIA PARA LA REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILO.

7.9 EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE CUPRAC ELECTROQUÍMICO

La capacidad antioxidante de un extracto natural se puede medir a través de una prueba electroquímica entre otras. En este caso, la medición de los valores de capacidad antioxidante se obtiene de manera indirecta ya que el agente antioxidante reaccionará con una especie oxidada $(Cu[(Nc)_2]^{2+})$ para formar posteriormente un complejo reducido $(Cu[(Nc)_2]^{+})$ como se muestra en la siguiente reacción:

$$a Cu[(Nc)_2]^{2+} + b AO_{red} \leftrightarrow c Cu[(Nc)_2]^{+} + d AO_{ox}^{+}$$

Donde AO_{red} es el agente antioxidante reducido y AO_{ox} es el agente antioxidante oxidado.

Al realizar una curva voltamperométrica el complejo reducido obtenido previamente $(Cu[(Nc)_2]^+)$ se oxidará $(Cu[(Nc)_2]^{2+})$, donde los valores del potencial de inicio de reacción y la corriente de pico proporcionarán información de la capacidad antioxidante del extracto.

El corrimiento del potencial hacia valores negativos está relacionado con un incremento en la cantidad del complejo reducido $Cu[(Nc)_2]^+$ debido a la capacidad antioxidante del extracto para donar electrones al complejo oxidado $Cu[(Nc)_2]^{2+}$.

Lo descrito anteriormente, está basado en la ecuación de Nernst dada por la siguiente expresión:

$$E = E^{0} - \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{Cu[(Nc)_{2}]^{+}}}{a_{Cu[(Nc)_{2}]^{2+}}}$$

Donde es posible reescribirla como:

$$E = E^{0} - \frac{RT}{F} \left(\ln Cu[(Nc)_{2}]^{+} - \ln Cu[(Nc)_{2}]^{2+} \right)$$

De acuerdo a la ecuación, existen dos casos: I) si la concentración del complejo oxidado $Cu[(Nc)_2]^{2+}$ es mayor, el potencial E aumentará, por lo tanto, su valor aumentará hacia valores más positivos. II) Si la concentración del complejo reducido $Cu[(Nc)_2]^+$ es mayor, el potencial E tenderá a disminuir y tomará valores más negativos. Debido a que el complejo reducido $(Cu[(Nc)_2]^+)$ es oxidado

durante la voltametría cíclica (**Figura 13**), es posible observar que el potencial E presenta un desplazamiento hacia valores negativos en función del aumento en la concentración del agente antioxidante. Esto significa que el agente antioxidante utilizado incrementa la concentración del complejo reducido ($Cu[(Nc)_2]^+$) (Espinosa-Acosta et al., 2018). Por lo tanto, la corriente es directamente proporcional a la concentración de la especie involucrada en la reacción (Cárdenas et al., 2014),(Apak et al., 2004).

En la voltamperometría cíclica, la corriente es una función del potencial aplicado y de esta manera es posible observar las reacciones que se llevan a cabo en el electrodo de trabajo. Así, el electrodo estando polarizado; es capaz de detectar cambios de corriente infinitesimales. Esta corriente dependerá del mecanismo en que la especie llega al electrodo, de su velocidad de transferencia electrónica, de los fenómenos de adsorción en el electrodo y de las reacciones químicas acopladas que ocurren antes o después de la reacción electroquímica.

La aplicación del potencial se lleva a cabo en el sentido de la oxidación donde inicialmente no se presentan procesos de oxidación debido a que la prueba se realiza a partir del potencial de reposo. Posteriormente conforme la curva presenta un incremento en los valores de corriente, significa que el proceso de oxidación se está llevando a cabo sobre la superficie del electrodo de trabajo mediante la adsorción del complejo reducido $Cu[(Nc)_2]^+$. Al aumentar el potencial, la corriente presenta un punto máximo debido a la máxima concentración y conversión de la especie y posteriormente se presenta una disminución en los valores de corriente debido a la no adsorción de moléculas reducidas por efecto de los valores de potencial (Aikens, 2009).

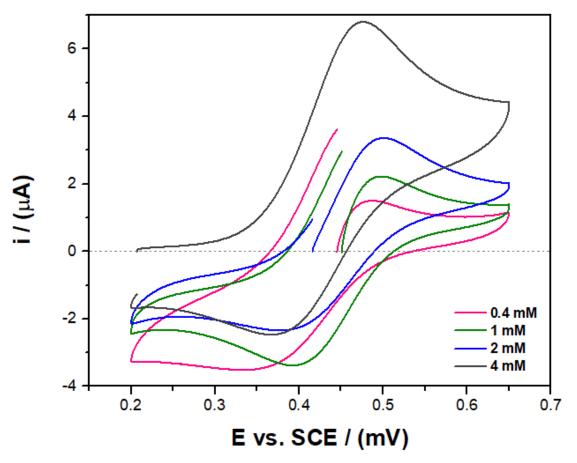


Figura 13. Voltamperometría cíclica del extracto de la zanahoria negra con concentraciones de 0.4, 1, 2 y 4 mM.

Basándose en la ecuación de la recta de la **Figura 14** donde se muestra la capacidad antioxidante electroquímica del Trolox a distintas concentraciones, se obtuvo la corriente anódica del extracto correspondiente a la concentración de 0.4, 1, 2 y 4 mM para poder realizar su comparación con el extracto.

La ecuación de la recta de la Figura 14 está definida como:

$$i = 5062 * (concentración) + 0.6876$$

Por lo tanto, para la concentración de 0.4 mM en Trolox según la Figura 14 la corriente es de:

$$i = 3.0722 \,\mu A$$

Para la concentración de 1 mM en Trolox tenemos que:

$$i = 5062 * (.001) + 0.6876$$

$$i = 5.7496 \, \mu A$$

Ahora, para la concentración de 2mM en Trolox:

$$i = 5062 * (.002) + 0.6876$$

 $i = 10.8116 \,\mu A$

Por último, para la concentración de 4 mM del Trolox tenemos que:

$$i = 5062 * (.004) + 0.6876$$

 $i = 20.9356 \,\mu A$

Tomando en cuenta así que la corriente obtenida en la voltamperometría cíclica depende de la concentración del complejo reducido $Cu[(Nc)_2]^+$, es posible determinar la capacidad antioxidante relacionada a un método electroquímico (capacidad antioxidante electroquímica, CAE) dividiendo la corriente de pico de oxidación del complejo reducido $Cu[(Nc)_2]^+$ entre la corriente de pico de oxidación del Trolox. (Arts, Haenen, Voss, & Bast, 2004)

$$CAE = rac{i_{pico\ de\ oxidación\ AOx}}{i_{pico\ de\ oxidación\ Trólox}}$$

En la relación anterior, es fácil observar que si el valor del cociente obtenido es > 1 significa que la CAE del extracto presenta una mejor capacidad reductora que el Trolox. En el caso contrario, donde el cociente sea < 1 la CAE del extracto tendrá menor capacidad reductora que el Trolox.

Calculando la CAE del extracto para una concentración de 0.4 mM:

$$CAE = \frac{1.4921}{3.0722}$$

$$CAE = 0.4856$$

Calculando la CAE del extracto para una concentración de 1mM:

$$CAE = \frac{2.21735}{5.7496}$$

$$CAE = 0.3856$$

Evaluando la CAE del extracto con una concentración de 2mM, tenemos que:

$$CAE = \frac{3.35636}{10.8116}$$

$$CAE = 0.3104$$

Calculando la CAE del extracto con una concentración de 4 mM, tenemos que:

$$CAE = \frac{6.8043}{20.9356}$$

$$CAE = 0.3250$$

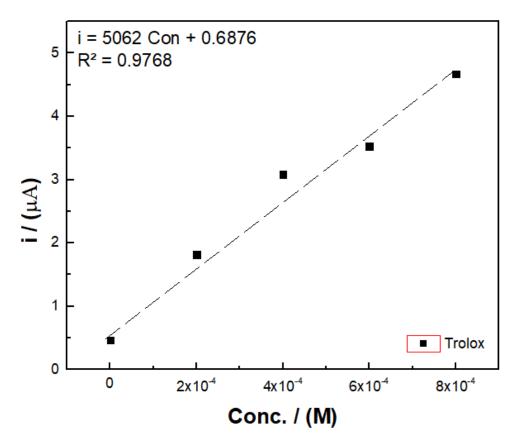


Figura 14. Regresión lineal de la capacidad antioxidante electroquímica del Trolox.

Durante las mediciones de las voltamperometrías cíclicas mostradas en la **Figura 13**, se comenzó la experimentación con el extracto a las concentraciones de 1 y 2 mM las cuales mostraron un aumento en el pico de corriente de oxidación a medida que la concentración aumentó. Aunado a esto, se realizó una medición a una concentración de 4 mM mostrando de la misma manera un aumento en la corriente de pico.

Tomando como base estos resultados, se determinó la capacidad antioxidante electroquímica del extracto con respecto al Trolox teniendo mejores resultados a menores concentraciones.

Derivado de esto, se realizó una nueva medición a una concentración de 0.4 mM con el motivo de comprobar una mayor capacidad antioxidante electroquímica en menores concentraciones.

Se obtuvo una mayor CAE para la concentración de 0.4 mM en comparación con las concentraciones restantes. Por lo tanto, es posible concluir que durante el uso de este tipo de compuestos fenólicos empleados como agentes reductores es recomendable mantenerlos en bajas concentraciones para una mayor actividad antioxidante debido a la inhibición reductora que se presenta en altas concentraciones.

8 APLICACIONES TECNOLÓGICAS

El extracto se utilizó como colorante alimenticio natural en un modelo de yogur en la cual se analizó su vida de stock durante 28 días. El cambio de color se analizó con un script en Matlab donde se hizo un cambio de RGB a LAB para su estudio, dándonos como resultado su luminosidad de negro a blanco (L*), el cambio de las escalas de color verde a rojo (a*), amarillo a azul (b*), coordenadas polares de A y B (Hue*), y la tangente de b*/a* (Chroma*) mostrados en cada tabla respectivamente.

Se realizó una comparación entre un yogur utilizando como colorante rojo grosella comercial de la marca Duchi y utilizando el extracto de la zanahoria negra. En ambos casos se utilizó 1 mg de colorante por cada gramo de yogur. Los resultados y la variación de color se muestran en la **Figura** 15 y **Tabla 8**.

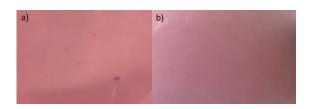


Figura 15. a) Yogur con colorante rojo grosella. b) después de 25 días.

	DIA T	Dia 25
L*	59.7588	54.9029
a*	29.1415	20.6619
b*	14.0448	6.0520
Hue	0.2282	0.0856
Chroma	32.3494	21.5300

Tabla 8. VALORES OBTENIDOS DE COLOR EN LABHUECHROMA.

Según los datos recabados, podemos ver que la luminosidad (L*), así como los demás factores analizados en los cambios de color (a*, b*) se vieron reducidos, por lo que el colorante comercial rojo grosella presenta una notable degradación durante los 25 días.

El análisis del extracto como colorante, se extrajo utilizando ácido cítrico para una mayor duración y estabilidad. La extracción se realizó de la siguiente manera.

Se preparó una solución de 150 mL 85:15 v/v de etanol y ácido cítrico respectivamente con un pH de 1.4. Posteriormente se licuaron 150 g de zanahoria negra durante 5 minutos y se filtró con una tela de manta.

Realizando el método de pH diferencial, se obtuvo un resultado de 126.5867 mg de antocianinas monoméricas por litro de solución. Para añadir 1 mg de antocianinas por gramo de yogur, se obtuvo la cantidad de 0.1265 miligramos por mL. Por lo tanto, se requieren añadir 7.9051 mL para obtener la cantidad de 1 mg de antocianinas con ácido cítrico. Los resultados y su variación del color se muestran en la **Figura 16** y en la **Tabla 9**.

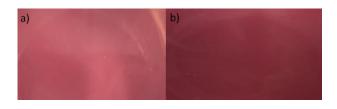


Figura 16. a) Yogur con colorante de zanahoria negra con ácido cítrico. b) después de 25 días.

	Día 1	Día 25
L*	49.1726	32.9514
a*	34.7322	32.0276
b*	15.5388	15.2711
Hue	0.1915	0.2235
Chroma	38.0497	35.4820

Tabla 9. VALORES OBTENIDOS DE COLOR EN LABHUECHROMA.

Los datos mostrados en la **Tabla 9** indicaron que la escala de amarillo a azul (b*) no presentó un cambio notable. Por otro lado, la luminosidad (L*) del yogur disminuyó, así como la escala de verde a rojo (a*). Estos cambios pueden deberse a que naturalmente el yogur se tiende a acidificar con el tiempo. De esta manera se exhibe un color más oscuro a los 25 días ya que las antocianinas presentan una mayor estabilidad en pH ácidos. Por lo tanto, el uso de este colorante natural en este modelo alimenticio presenta una menor degradación y mayor duración que el colorante comercial.

Adicionalmente como otras futuras aplicaciones, el extracto obtenido de la zanahoria negra presenta una buena capacidad antioxidante y podría ser utilizado para la síntesis verde de nanopartículas, empleando así reductores naturales con una mayor posibilidad de ser biocompatibles en comparación con reductores sintéticos.

Así mismo, puede ser utilizado como colorante alimenticio, y en el uso de matrices poliméricas biodegradables para la conservación de alimentos.

9 CONCLUSIONES

- Se logró establecer un método de extracción acuoso de los compuestos encontrados en la zanahoria negra y se llevó a cabo su caracterización fisicoquímica.
- Se realizó la cuantificación de antocianinas monoméricas presentes en la extracción realizada de la zanahoria negra en medio acuoso.
- Se confirmó la presencia de las estructuras pertenecientes a los flavonoides mediante espectroscopía UV-Visible y espectroscopía infrarroja.
- Se realizaron pruebas espectroscópicas para la evaluación de la capacidad antioxidante según la presencia de polifenoles en el extracto, cuantificados mediante el método de Folín-Ciocalteu y la determinación de azúcares totales.
- Los resultados anteriores fueron comparados con las pruebas de CUPRAC electroquímico y DPPH, donde las antocianinas mostraron resultados comparables con los estándares utilizados en dichas pruebas.
- Por otro lado, teniendo en cuenta su estabilidad debido al cambio de pH, según los resultados obtenidos, las antocianinas pueden ser aplicadas a estudios biológicos en diversos organismos con un pH fisiológico debajo de 8 y se utilizó en un modelo alimenticio de yogur como colorante natural.

10 Bibliografía

- Abu-Fayyad, A., & Nazzal, S. (2017). Gemcitabine-vitamin E conjugates: Synthesis, characterization, entrapment into nanoemulsions, and in-vitro deamination and antitumor activity.

 *International Journal of Pharmaceutics, 528(1–2), 463–470.

 https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.031
- Aikens, D. A. (2009). *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. *Journal of Chemical Education* (Vol. 60). https://doi.org/10.1021/ed060pa25.1
- Akhtar, S., Rauf, A., Imran, M., Qamar, M., Riaz, M., & Mubarak, M. S. (2017). Black carrot (Daucus carota L.), dietary and health promoting perspectives of its polyphenols: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *66*, 36–47. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.004
- Algarra, M., Fernandes, A., Mateus, N., de Freitas, V., Esteves da Silva, J. C. G., & Casado, J. (2014).

 Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (Daucus carota L. ssp. sativus var. atrorubens Alef.) from Cuevas Bajas, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 71–76. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.005
- Andersen, O. M., Markham, K. R., & Cadenas, E. (2006). Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Angewandte Chemie International Edition (Vol. 45). https://doi.org/10.1201/9780203904046
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jf048741x
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H. P., & Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*. https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.08.004
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability A review. International Journal of Food Science and Technology. https://doi.org/10.1111/j.1365-

2621.2007.01668.x

- Ba, K., Aguedo, M., Tine, E., Paquot, M., Destain, J., Thonart, P., ... Properties, F. (2012). *Experiment No . 5 Starch Hydrolysis By Amylase. European Food Research and Technology* (Vol. 236). https://doi.org/10.1007/s00217-013-1937-6
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221–247. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. Food Chemistry, 58(1–2), 103–109. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00222-1
- Cadenas, E. (2001). Handbook of Antioxidants. https://doi.org/10.1201/9780203904046
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., Yang, Z., & Lu, B. (2011). Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit. *Food Chemistry*, *125*(1), 145–149. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.051
- Cárdenas, A., Gómez, M., & Frontana, C. (2014). Relationship between the chemical structures of antioxidants and the differences in their cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) by electrochemical methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.07.019
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- Chang, R., & College, W. (2002). Quimica. Mc Graw Hill.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides.

 Critical Reviews in Food Science and Nutrition. https://doi.org/10.1080/10408390701425615
- Es-Safi, N. E., Ghidouche, S., & Ducrot, P. H. (2007). Flavonoids: Hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules*.

- https://doi.org/10.3390/12092228
- Espinosa-Acosta, G., Ramos-Jacques, A. L., Molina, G. A., Maya-Cornejo, J., Esparza, R., Hernandez-Martinez, A. R., ... Estevez, M. (2018). Stability analysis of anthocyanins using alcoholic extracts from black carrot (Daucus carota ssp. Sativus var. Atrorubens alef.). *Molecules*, 23(11). https://doi.org/10.3390/molecules23112744
- Fukui, Y., Kusumi, T., Masuda, K., Iwashita, T., & Nomoto, K. (2002). Structure of rosacyanin B, a novel pigment from the petals of Rosa hybrida. *Tetrahedron Letters*. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00305-2
- Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biol. Colomb.*, *13*(3), 27–36.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., & Dangles, O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jf025938l
- Grisel, M., & Georgina, L. (2007). Estudios de separación y caracterización de pigmento en caldos de fermentación de Botryodiplodia theobromae. *ICIDCA, Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar, XLI*, 27–34.
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008
- Halvorsen, B. L., & Blomhoff, R. (2011). Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.142
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001
- HPLC Asegurando la calidad en el producto. (n.d.). Retrieved November 13, 2018, from http://www.laboratoriosplanes.es/hplc-asegura-calidad-en-el-producto/
- José, F., & Alcántara, M. (2018). *Universidad De Jaén*. Retrieved from http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/8308/1/Martos_Alcantara_Francisco_Jose_TFM.pdf
- Jurado Teixeira, B., Aparcana Ataurima, I., Villarreal Inca, L., Ramos Llica, E., Calixto Cotos, M.,

- Hurtado Manrique, P., & Acosta Alfaro, K. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (Physalis peruviana L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*.
- Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Characterization of phenolic acids in black carrots (Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.) by high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *18*(12), 1331–1340. https://doi.org/10.1002/rcm.1496
- Kiokias, S., & Gordon, M. H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International*. https://doi.org/10.1081/FRI-120037155
- Krummel, D. A., Seligson, F. H., & Guthrie, H. A. (1996). Hyperactivity: Is Candy Causal? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. https://doi.org/10.1080/10408399609527717
- Lee, D. W., & Gould, K. S. (2002). Anthocyanins in leaves and other vegetative organs: An introduction. *Advances in Botanical Research*. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)37040-X
- Lopaczynski, W., & Zeisel, S. H. (2001). Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*. https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00288-8
- MacDougall, D. . (2000). Coloring of Food, Drugs, and Cosmetics. *Food Quality and Preference*. https://doi.org/10.1016/S0950-3293(99)00075-0
- Mónica Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2005). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. In *Handbook of Food Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18
- Núñez-Córdoba, J. M., & Martínez-González, M. a. (2011). Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. https://doi.org/10.2174/156802611796235143
- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Scheerens, J. C., & Miller, A. R. (2006). Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- https://doi.org/10.1021/jf051960d
- Pravst, I., Žmitek, K., & Žmitek, J. (2010). Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. https://doi.org/10.1080/10408390902773037
- Quintanar Escorza, M. A., & Calderón Salinas, J. V. (2009). La Capacidad Antioxidante Total. Bases Y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México*. https://doi.org/10.1021/jf501503h
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015
- Reyes Munguía, A., Galicia Cardoso, M. T., & Luisa, C. I. M. (2011). Antioxidantes: La magia de lo natural. *Tlatemoani*.
- Reyes Pineda, J. A. R., & Hernándeza, L. C. C. (2016). Análisis de la electrotransformación de lignina en la guadua "Angustifolia Kunth" del Quindío. *Revista Ciencia En Desarrollo*, *6*(1), 55–60.

 Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882015000100007%0Ahttp://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882015000200006&lang=pt
- Sellés, A. J. N. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades Antioxidant therapy, oxidative stress and antioxidant products: challenges and opportunities CONCEPTOS Y DEFINICIONES DE LA TERAPIA ANTIOXIDANTE. *Revista Cubana de Salud Pública*.
- Sies, H. (1985). Introductory remarks. In Oxidative stress.
- Sistemas de cromatografía líquida. (n.d.). Retrieved November 13, 2018, from https://www.malvernpanalytical.com/es/products/category/liquid-chromatography-systems
- Skoog, D. A., & Crouch, S. R. (n.d.). *Analise Instrumental*.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007).

 Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050

Voet, D., & Voet, J. (2011). *Biochemistry. John Wiley & Sons*. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Wrolstad, R. E. (2004). Symposium 12: Interaction of natural colors with other ingredients - Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, *69*(5), C419–C421. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x