



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Orgánica y Fisicoquímica

**ESTUDIO DE REACTIVIDAD DE LUTEOLINA EN
SU ESTADO LIBRE Y FORMANDO COMPLEJOS
DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICA

MURIEL MARÍA NATALIA ALFARO MARABOLÍ

**PATROCINANTE
DIRECTOR DE TESIS
DRA. CAROLINA JULLIAN MATTHAEI
Departamento de Química Orgánica y
Fisicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. CLAUDIO OLEA AZAR
Departamento de Química Inorgánica y
Analítica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
UNIVERSIDAD DE CHILE**

SANTIAGO, CHILE, 2009

AGRADECIMIENTOS

Hoy, al término de esta importante etapa de mi vida, se me viene a la memoria muchísimos recuerdos lindos, como también los que no fueron “especialmente lindos”, pero sí fundamentales en mi desarrollo y crecimiento como persona. Es por eso, que ante todo, deseo agradecer el incondicional y amoroso apoyo de mis padres María de los Ángeles y Luis, como también el de mis hermanos Catalina y Luis.

Es así, como también quiero agradecer la confianza, disposición, apoyo docente y personal brindado por mis profesores guías: Dra. Carolina Jullian y Dr. Claudio Olea.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de universidad, amigas, amigos, y al apoyo y compañía brindada por Pablo. Son ellos también, partícipes indirectamente de este paso que vengo dando. Estoy segura que sin su cariño y amor, el compartir penas, risas y alegrías, sueños y ganas en esta vida, este proceso habría sido más difícil.

En particular, quiero agradecer la ayuda ofrecida por Germán Barriga en el uso del equipo de EPR. Y al profesor Julio de la Fuente, por el uso temporal de las dependencias de su laboratorio.

Salud.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	Página iii
INDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	v
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
- REACTIVOS	13
- EQUIPOS	13
- METODOLOGÍAS	14
- Preparación de los complejos de inclusión.	14
- Determinación de la estequiometría del complejo de inclusión.	14
- Determinación de la constante de asociación	15
- Determinación de la actividad antioxidante.	17
- ORAC _{FL}	17
- ORAC _{PGR}	19
- DPPH UV-VIS	20
- REE:	22

- Atrapamiento radical DPPH	23
- Atrapamiento radical Galvinoxil	24
- Atrapamiento radical OH mediante Spin Trapping	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
- Determinación de la estequiometría de los complejos ciclodextrina - luteolina	26
- Determinación de la Constante de Asociación de los complejos ciclodextrina -luteolina	27
- Evaluación de la actividad antioxidante de luteolina y sus complejos de inclusión con ciclodextrinas.	30
- ORAC _{FL}	30
- ORAC _{PGR}	35
- DPPH UV-VIS	39
- REE:	43
- Atrapamiento radical DPPH	43
- Atrapamiento radical Galvinoxil	45
- Atrapamiento radical OH mediante Spin Trapping	47
- Comparación de la actividad antioxidante de luteolina y sus complejos de inclusión con otros flavonoides, mediante ORAC _{FL} , ORAC _{PGR} .	51
- Análisis comparativo de flavonoides en su estado libre.	51
- Análisis comparativo entre complejos de inclusión con β CD.	56
- Análisis comparativo entre complejos de inclusión con DM- β CD.	61
- Análisis comparativo entre complejos de inclusión con HP- β CD.	64
- Análisis comparativo para flavonoides libres y formando complejos de inclusión con ciclodextrinas atrapando DPPH [•] por UV-VIS.	66
- Apigenina y sus complejos de inclusión.	66
- Galangina y sus complejos de inclusión.	68
- Canferol y sus complejos de inclusión.	69
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXO 1	78
ANEXO 2	79
ANEXO 3	80

INDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A/A₀:	Abosrbancia adimensional.
AAPH:	2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro.
ABC:	Área bajo la curva.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
AH:	Antioxidante.
API:	Apigenina; 5,7 4` trihidroxiflavona.
BDE:	Energía de disociación de enlace.
CD:	Ciclodextrina.
DFT:	Teoría de densidad funcional.
DMPO:	Atrapador de radical; 5,5-dimetil-1-pirrolin N-oxido.
DMPO-OH:	Spin aducto DMPO con radical hidroxilo.
DMβCD:	Dimetil beta ciclodextrina.
DPPH:	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
F/F₀:	Fluorescencia adimensional.
FL:	Fluoresceína; sal disodio de 3',6'-dihidroxi-spiro [3H-isobenzofuran-1,9'-xanten]-3-ona.
GAL:	Galangina ; 3,5,7-trihidroxiflavona.
GVX:	Radical Galvinoxil; 2,6-Di-tert-butil-α-(3,5di-tert-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-iliden)-p-toliloxi).
HPβCD:	Hidroxipropil beta ciclodextrina.
K:	Constante de asociación.
k̂:	Constante de velocidad.
KAEM:	Canferol; 3, 5, 7,4`-tetrahidroxiflavonol.
Log:	Logaritmo.
LUT:	Luteolina; 5, 7,3',4`-tetrahidroxiflavona.
LUT_f:	Luteolina libre
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
OH[•] :	Radical hidroxilo.
ORAC:	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity).

PGR:	Rojo pirogallol.
REE:	Resonancia de espín electrónico.
RO•:	Radical alcohóxico.
ROH:	Alcohol.
ROO•:	Radical peroxilo.
ROOH:	Peróxido.
T_{EQ}:	Trolox equivalente.
TROLOX:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.
UV:	Ultravioleta.
V_i:	Velocidad inicial.
βCD:	Beta ciclodextrina.
ηM:	Concentración nanomolar.
μM:	Concentración micromolar.

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Constantes de Asociación obtenidas para los complejos de inclusión de LUT con β -CD, HP β -CD y DM β -CD.	29
Tabla 2	Valores de promedio de la pendiente de las curvas de regresión ABC neta en función de la concentración, coeficiente de correlación y el valor de T_{EQ} para LUT y sus complejos de inclusión con β -CD, HP β -CD y DM β -CD.	33
Tabla 3	K_a : Constante de Asociación determinado por Benesi-Hildebrand y % de LUT libre concentración de LUT libre para cada complejo de inclusión.	34
Tabla 4	Modelos cinéticos simplificados para describir las oxidaciones competitivas de las moléculas sonda PGR y FL con \bar{k}_1 y \bar{k}_2 constantes de velocidad asociadas a cada reacción química, inducidas por el radical peroxilo para las metodologías ORAC _{PGR} y ORAC _{FL} , respectivamente.	37
Tabla 5	Velocidades Iniciales para LUT y sus complejos de inclusión con β CD, DM β CD y HP β CD a una concentración de 41,8 η M.	40
Tabla 6	Número de hidrógenos cedidos por LUT y sus complejos de inclusión con CD para el apagamiento del radical DPPH.	41
Tabla 7	Área del Peak y Porcentaje de DPPH' remanente para LUT y sus complejos con β -CD, DM β -CD y HP β -CD.	44
Tabla 8	Área del Peak y Porcentaje de GVX' remanente para LUT y sus complejos con β -CD, DM β -CD y HP β -CD.	46
Tabla 9	Área del Peak y Porcentaje de OH' remanente para LUT y sus complejos con β -CD, DM β -CD y HP β -CD.	48
Tabla 10	Valores de Trolox equivalentes para ORAC _{FL} y ORAC _{PGR} obtenidos para LUT, API, GAL y KAEM en su estado libre.	53

Tabla 11	Valores de Trolox equivalentes para $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ obtenidos para los complejos de inclusión de LUT, API, GAL y KAEM con β -CD.	56
Tabla 12	Entalpías de disociación de enlace relativas para las especies radicalarias de apigenina y luteolina	58
Tabla 13	Valores de Trolox equivalentes para $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ obtenidos para los complejos de inclusión de LUT, API, GAL y KAEM con $DM\beta$ -CD.	61
Tabla 14	Valores de Trolox equivalentes para $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ obtenidos para los complejos de inclusión de LUT, API, GAL y KAEM con $HP\beta$ -CD.	64
Tabla 15	Número de hidrógenos cedido por LUT y sus complejos de inclusión con CD para el apagamiento del radical DPPH.	67

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura básica de un flavonoide.	3
Figura 2	Mecanismo de acción antioxidante del flavonoide 3',4'diOH.	5
Figura 3	Mecanismo de acción antioxidante de C3 hidroxiflavona.	5
Figura 4	Sitios de enlace posibles para quelación de metales.	6
Figura 5	Estructura química de luteolina.	7
Figura 6	Estructuras químicas de α -CDs, β -CDs y γ -CDs.	9
Figura 7	Dimensiones geométricas aproximadas de a) α -CDs, b) β -CDs, c) γ -CDs.	9
Figura 8	Estructuras químicas de API, GAL y KAEM.	10
Figura 9	Estructura química DMPO.	25
Figura10	Gráfico de variación continua para complejos de LUT con β -CD, DM β -CD y HP β -CD.	26
Figura 11	Espectro de fluorescencia de LUT y sus complejos de inclusión con HP β -CD (concentración constante de LUT de 0,01mM y concentración de CD de desde 0,03 hasta 1mM).	28
Figura 12	Gráfico del inverso de la intensidad de fluorescencia en función del inverso de la concentración de CD para complejos de inclusión de LUT con β -CD ($r^2=0,975$), DM β -CD ($r^2=0,985$) y HP β -CD ($r^2=0,989$).	29
Figura 13	Estructura química de Trolox.	30

Figura 14	Perfiles cinéticos de consumo de FL inducidos por AAPH en presencia de Trolox a diferentes concentraciones.	31
Figura 15	Regresión lineal de ABC neta de Trolox a diferentes concentraciones de Trolox (desde 0,67 μ M hasta 3,35 μ M). ABC neta = ABC muestra – ABC blanco.	32
Figura 16	(a) Perfiles cinéticos de consumo de FL inducidos por AAPH en presencia de LUT a diferentes concentraciones. (b) Regresión lineal de ABC neta de Trolox a diferentes concentraciones de LUT (desde 0,14 μ M hasta 0,72 μ M).	33
Figura 17	(a) Perfiles cinéticos de consumo de PGR inducidos por AAPH en presencia de Trolox a diferentes concentraciones. (b) Regresión lineal de ABC neta de Trolox a diferentes concentraciones de Trolox (desde 16,4 μ M hasta 142 μ M).	35
Figura 18	Perfiles cinéticos de consumo de PGR inducidos por AAPH en presencia de LUT a diferentes concentraciones.	38
Figura 19	Apagamiento de DPPH $^{\bullet}$ (50 μ M) por Luteolina 15 μ M entre 0 y 20 segundos de reacción.	39
Figura 20	Cinética de decaimiento del radical DPPH por Luteolina a diferentes concentraciones.	40
Figura 21	Gráfico de regresión entre el Log (V_i) obtenidas, en función del Log [LUT] para la determinación de los hidrógenos lábiles.	41
Figura 22	Espectro de REE del radical DPPH.	43
Figura 23	Espectro de REE del radical DPPH. (a) DPPH sin adición de antioxidante (blanco). (b) DPPH con 5 μ M de β CD-LUT.	44
Figura 24	Espectro de REE del radical GVX.	45
Figura 25	Espectro de REE del spin aducto DMPO-OH.	47

Figura 26	Porcentajes de radical remanente obtenidos mediante REE de: GVX^{\bullet} , $DPPH^{\bullet}$ y OH^{\bullet} para cada uno de los antioxidantes: blanco, LUT y sus complejos con β -CD, $DM\beta$ -CD y $HP\beta$ -CD.	49
Figura 27	Estructuras moleculares de luteolina, apigenina, galangina y Canferol.	52
Figura 28	Estructura molecular de quercetina.	55
Figura 29	Perfiles cinéticos de consumo de FL inducidos por AAPH en presencia de (a) β -CD-API y (b) β -CD-LUT a diferentes concentraciones.	57
Figura 30	Perfiles cinéticos de consumo de PGR inducidos por AAPH en presencia de (a) β -CD-KAEM a diferentes concentraciones.	60
Figura 31	Velocidades iniciales obtenidas por apagamiento del radical DPPH por API y sus complejos de inclusión con β -CD, $DM\beta$ -CD y $HP\beta$ -CD a una concentración de $115\eta M$, mediante UV-VIS.	67
Figura 32	Velocidades iniciales obtenidas por apagamiento del radical DPPH por API y sus complejos de inclusión con β -CD, $DM\beta$ -CD y $HP\beta$ -CD a una concentración de $115\eta M$, mediante UV-VIS.	68
Figura 33	Velocidades iniciales obtenidas por apagamiento del radical DPPH por KAEM y sus complejos de inclusión con β -CD, $DM\beta$ -CD y $HP\beta$ -CD a una concentración de $39,8\eta M$, mediante UV-VIS.	70

RESUMEN

ESTUDIO DE REACTIVIDAD DE LUTEOLINA EN SU ESTADO LIBRE Y FORMANDO COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

En este trabajo, se presenta un estudio de la capacidad antioxidante y de reactividad del flavonoide luteolina (LUT) en su estado libre, y formando complejos de inclusión con ciclodextrinas (β ciclodextrina, 2,6-dimetil- β ciclodextrina y 2-hidroxipropil- β ciclodextrina), a través de diversas metodologías. Además, se procedió a realizar un análisis comparativo de estructura – actividad, a partir de los resultados obtenidos de reactividad evaluados para luteolina, comparados con los flavonoides apigenina (API), galangina (GAL) y canferol (KAEM), con sus respectivos complejos de inclusión.

En una primera instancia, se determinó la estequiometría de los complejos de inclusión de LUT- β CD mediante el gráfico de Job, resultando para todos los casos una relación 1:1. Posteriormente, se determinaron las constantes de asociación, por medio de la metodología de Benesi- Hildebrand utilizando la espectroscopía de fluorescencia. Dichos resultados, presentan valores de constantes de 1263, 4885 y 7124 M⁻¹ para cada complejo de inclusión con β CD, DM- β CD y HP- β CD, respectivamente.

Los estudios de reactividad y capacidad antioxidante, se realizaron mediante las metodologías de ORAC_{FL}, ORAC_{PGR} y DPPH por UV-VIS mediante la aproximación de las velocidades iniciales, para todos los flavonoides y sus complejos de inclusión con ciclodextrinas. Además, para luteolina y sus complejos, se realizaron estudios utilizando técnicas de espectroscopía de resonancia espín electrónico (REE) para complementar los resultados obtenidos. En particular, se determinó la reactividad del flavonoide y sus complejos, a través de la interacción con los radicales DPPH (2,2-Di(4-tert-octifenil)-1-picrilhidrazil), GVX (2,6-Di-tert-butil- α -(3,5di-tert-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-iliden)-p-toliloxi)) y OH mediante la técnica Spin Trapping.

Los resultados obtenidos, indican que luteolina mantiene o aumenta levemente la capacidad antioxidante y la reactividad atrapando diferentes radicales libres formando complejos de inclusión con ciclodextrinas. Por otra parte, los estudios de reactividad realizados para flavonoides libres por medio de las técnicas ORAC, indican que el flavonoide que presenta una mayor capacidad antioxidante corresponde a KAEM, luego, a un mismo nivel se encuentra LUT y API, y el de menor capacidad antioxidante corresponde a GAL. Para todos los flavonoides, el proceso de inclusión con las diversas ciclodextrinas no implicó una disminución en su capacidad antioxidante. Finalmente, a partir del análisis de los resultados obtenidos mediante las diversas técnicas utilizadas, se presenta -en términos generales- una alta coherencia entre las diversas metodologías utilizadas, y una muy buena relación estructura-actividad para los diversos flavonoides estudiados

SUMMARY

REACTIVITY STUDY OF LUTEOLIN IN FREE STATE AND FORMING INCLUSION COMPLEXES WITH CYCLODEXTRINS

In this work, we present a study of reactivity and antioxidant capacity of the flavonoid luteolin (LUT) in free state, and forming inclusion complexes with cyclodextrins (β -cyclodextrin, 2,6-dimethyl- β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin). Beside, a comparative analysis of structure-activity is realized from the results obtained to LUT by mean different methodologies and compare with the other flavonoid: apigenin (API), galangin (GAL) and canferol (KAEM), and its inclusion complexes.

In the first instance, we determine the stoichiometric of the inclusion complexes of LUT- β CDs by means of Job's plot, proving for all cases a 1:1 stoichiometry. The associations constant determined by Benessi-Hildebrand methodology, using fluorescent spectroscopy, were 1263, 4885 and 7124 M^{-1} with β CD, DM- β CD and HP- β CD, respectively.

The reactivity studies and antioxidant capacity were realized by ORAC_{FL}, ORAC_{PGR} and DPPH methodologies for flavonoids and its complexes. Furthermore, LUT and its inclusion complexes were studied using Electron Spin Resonance Spectroscopy (ESR) in order to include more relevant information. Specifically, we studied the flavonoid and its complexes reactivity with radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), GVX (2,6-Di-tert-butyl- α -(3,5di-tert-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-p-tolyloxy)) and OH by means of Spin Trapping technique .

The obtained results, indicate that LUT maintain or increase its antioxidant capacity and the reactivity catching different radical free on having formed inclusion complexes with cyclodextrins. On the other hand, the reactivity studies for the all flavonoids by ORAC

technique, indicate that KAEM showed the bigger antioxidant capacity compare LUT, API and GAL. For all flavonoid-complex the antioxidant capacities, were conserved compare free flavonoid. Finally, all methodologies used showed coherent results, and the experimental data were in agreement with the relationship between the activity and flavonoid structures.

INTRODUCCION

Diversas publicaciones en el ámbito de los estudios epidemiológicos^{1,2,3}, han venido a plantear la relevancia de investigar acerca de la relación entre el desarrollo de determinados hábitos alimenticios y la ocurrencia de ciertas patologías como cáncer, Alzheimer, arterosclerosis, diabetes y el envejecimiento prematuro, a parte de otras asociadas -genéricamente- al mal funcionamiento tanto del sistema cardiovascular, como cerebrovascular.

En este sentido, ha concitado -progresivamente- mayor interés en el campo científico la investigación que permita conocer y determinar la relación entre la ingesta de cierto tipo de alimentos y la ocurrencia sistemática de ciertas patologías. Proponiendo entonces, concebir a los alimentos -para efectos de la investigación científica- no sólo como paliativos de las deficiencias nutricionales, sino que también como agentes que permitirían proteger la salud y el bienestar, o bien disminuir el nivel de riesgo de enfermar de la población.

Entonces la idea de “calidad de los alimentos” no se relacionaría unívocamente con el problema de la nutrición, sino que también sería necesario investigar sobre la importancia de la presencia y comportamiento de ciertos compuestos en determinados tipos de alimentos, esta vez investigados desde sus modos de reacción⁴.

En ese contexto, algunos de los alimentos considerados saludables más allá de su calidad nutricional, serían principalmente las frutas, verduras, semillas, extractos de plantas, bebidas como la cerveza y el vino, entre otros productos. Característica fundamental de dichos productos, es que son excelentes fuentes de antioxidantes⁵, contienen en altas dosis vitaminas C, E y A, entre otros compuestos, utilizados por las plantas generalmente, para proteger su organismo de agentes oxidantes como los rayos ultravioleta y la polución ambiental.

Los radicales libres o agentes oxidantes, son moléculas inestables de alta energía con electrones desapareados en sus orbitas exteriores que tienden a reaccionar rápidamente con otros compuestos, y pueden desencadenar alteraciones fisiológicas indeseables para el organismo.

Los radicales libres son constantemente generados para propósitos específicos del organismo, y tienen variadas funciones, están involucrados en la producción de energía, la regulación del medio celular y señales intercelulares. A pesar de que el organismo humano cuenta con mecanismos efectivos para protegerse de los efectos nocivos de estos reactivos e inespecíficos compuestos químicos, cuando se produce un desbalance del metabolismo en la producción de radicales libres, estos atacan las membranas lipídicas de la célula, proteínas, enzimas y el ADN, produciendo oxidaciones que pueden causar daño celular. Se considera que este daño oxidativo, es el causante de una serie de enfermedades humanas como es el cáncer, enfermedades cardíacas y envejecimiento prematuro. Es por ello, que autores como J. M. Rouanet et al⁶ proponen, que una dieta rica en polifenoles podría modular enfermedades inflamatorias, como es por ejemplo, el origen de la arterosclerosis.

Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de estos compuestos fenólicos presentes naturalmente en la mayoría de los productos de origen vegetal. Estos compuestos tienen un esqueleto compuesto por 15 átomos de carbono y sustituciones dispuestos en tres anillos aromáticos designados como A, B y C (figura 1). Existen más de 8000 estructuras de flavonoides caracterizadas, clasificados de acuerdo a su nivel de oxidación del anillo C, este anillo corresponde al núcleo básico de 4-oxo-flavona (2-fenil-benzo-γ-pirano). Las familias más comunes son: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles, antocianinas e isoflavonas. La diversidad de cada tipo de flavonoide, depende de las sustituciones de hidroxilos, metoxilos y sulfatos del anillo patrón.

Los flavonoles son los flavonoides más abundantes en alimentos, entre éstos, los más comunes son quercetina, canferol y miricetina. Las flavanonas se encuentran

principalmente en frutas cítricas y el apio. La catequina (flavanol) se ha observado en grandes cantidades principalmente en vino tinto, como también en el té rojo y negro. Las antocianinas se encuentran preferentemente en fresas y frambuesas y las isoflavonas se hallan casi exclusivamente en los alimentos de soya⁷.

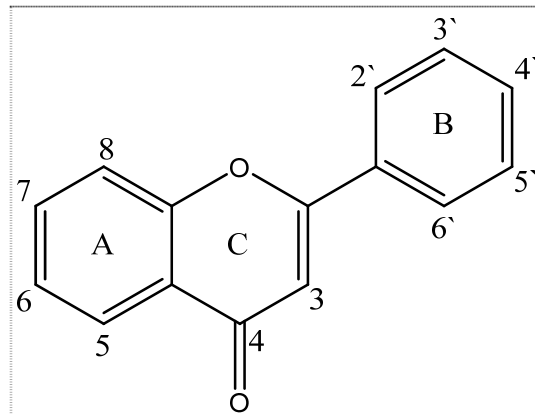


Figura 1: Estructura básica de Flavonoide.

La mayoría de las publicaciones realizadas acerca de los flavonoides, se basa en estudios respecto a su capacidad de actuar como antioxidantes, ya sea estudios *in vitro*^{8, 9, 10} como también estudios *in vivo*¹¹. Dichos compuestos ejercen como antioxidantes debido a que atrapan radicales libres, mediante diversos mecanismos, atribuidos principalmente a su estructura molecular. Es por esta razón que se asegura que la actividad antioxidante de los flavonoides, depende principalmente de su estructura química¹².

En términos generales, se ha aceptado que la actividad antioxidante de estos compuestos está influenciada principalmente por el número y posiciones de los grupos hidroxilo en el anillo A y B, además de la conjugación presente en el anillo B y C. De este modo, W. Bors¹³ describió tres criterios estructurales básicos que deben cumplir los flavonoides para un efectivo atrapamiento de radicales y/o potencial oxidativo¹⁴, estos son:

- En la estructura del anillo B, la presencia del orto-dihidroxi (catecol), el que confiere una alta estabilidad al radical fenoxilo *vía* donación de hidrógeno o bien por deslocalización de electrones.
- El doble enlace C2-C3 en conjugación con la función 4-oxo, el que determina la coplanaridad del heteroanillo y responsable de la deslocalización de electrones en el anillo B.
- La presencia de los grupos hidroxilo en la posición 3 y 5 del anillo C y A, respectivamente.

Además se puede agregar un criterio adicional:

- En ausencia de los grupos aromáticos de los grupos hidroxilo del anillo B, las sustituciones de di-OH formando catecol en el anillo A, pueden compensar y ser determinantes en la actividad anti-radicalaria.

Por tanto, la capacidad antioxidante de los flavonoides depende tanto de la combinación de estos elementos estructurales, como de dos factores principales: la alta reactividad relativa contra diferentes radicales y la alta estabilidad del intermediario formado, denominado comúnmente “radical antioxidante”.

Es así como, se han observado que los mecanismos de acción antioxidativo más importantes de los flavonoides se incluyen:

- Atrapamiento directo de radicales libres.
- Quelación de iones metálicos involucrados en la formación de radicales libres.
- Inhibición de enzimas involucradas en la producción de radicales o bien la activación de enzimas antioxidantes¹⁵.

La acción antioxidante de los flavonoides puede surgir del atrapamiento directo de especies reactivas de oxígeno mediante la transferencia directa de átomos de hidrógeno. Esto se considera generalmente el mecanismo principal de capacidad de atrapamiento de radicales libres de los flavonoides.

El requerimiento estructural para la actividad antioxidante de donación de hidrógeno corresponde a la presencia de la función di-hidroxi en el anillo B, el doble enlace C2-C3 y el grupo carbonilo en el anillo C.

En el mecanismo de transferencia del átomo de hidrógeno, los grupos hidroxilo donan un hidrógeno al radical, estabilizándolo y aumentando la estabilidad relativa del radical fenoxilo del flavonoide. Dicho radical formado, puede reaccionar con un segundo radical $RO\cdot$, adquiriendo la estructura de una quinona estable como se muestra en la figura 2.

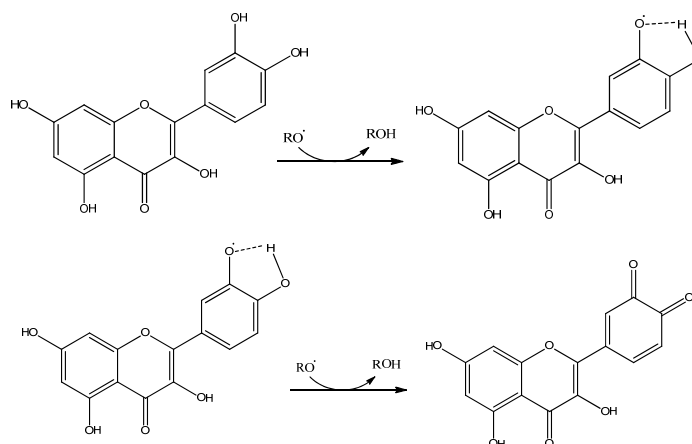


Figura 2: Mecanismo de acción antioxidante del flavonoide 3',4'diOH

Por otra parte, el mecanismo de donación de electrones, puede ser válido para las monoxidroxiflavonas, donde la donación del átomo de hidrógeno no es posible estabilizar con otro hidroxilo estabilizándose debido a la formación del catión radical respectivo como se presenta en la figura 3.

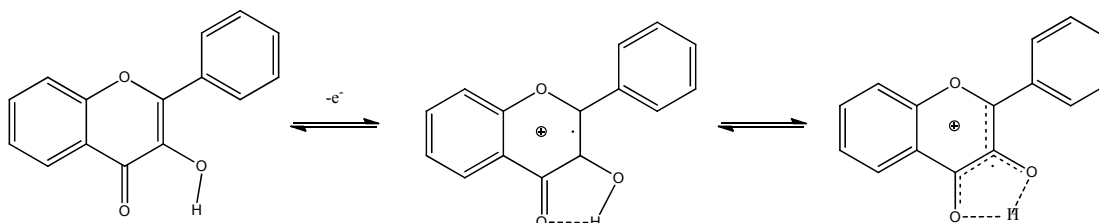


Figura 3: Mecanismo de acción antioxidante de C3-Hidroxiflavona.

El mecanismo de acción de importancia biológica de estos polifenoles, corresponde a la quelación de iones metálicos, tales como el Cu^+ y el Fe^{+2} , que juega un importante rol en el metabolismo del oxígeno y la formación de radicales libres. El cobre I y el hierro II ayudan a la formación de especies reactivas de oxígeno, como es el radical hidroxilo que es altamente agresivo.



Esto ocurre principalmente con los flavonoides 3', 4'- diOH en el anillo B, grupos OH en la posición C3 y C5 y el grupo carbonilo en la posición C4, como se muestra en la figura 4.

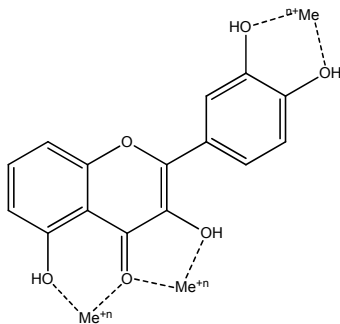


Figura 4: Sitios de enlace posibles para quelación de metales.

Y por último, se ha observado que los flavonoides pueden inhibir enzimas tales como: xantina oxidasa, lipoxigenasa¹⁴, prostaglandina transferasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa y NADPH oxidasa entre otras, relacionadas en el origen de tumores debido a que están involucradas con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como también inducen a la detoxificación de sistemas enzimáticos como la glutatión-S-transferasa¹⁶.

Luteolina

La luteolina (LUT) es un importante miembro del grupo de los flavonoides, se clasifica en la familia de las flavonas. En su estructura molecular – que se presenta en la figura

5- contiene el grupo orto-dihidroxi en el anillo B, doble enlace C2-C3 en conjugación con la función 4-oxo, no contiene un hidroxilo en la posición 3 sino que en la posición 5 y 7.

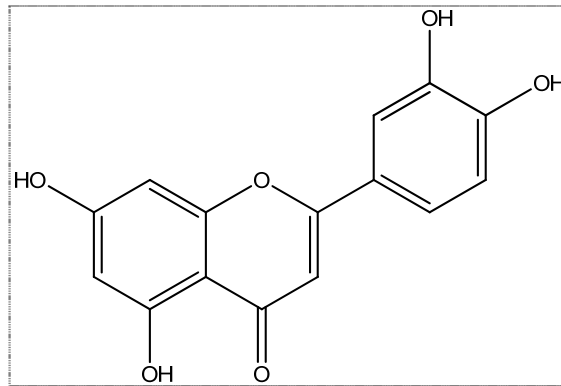


Figura 5: Estructura química de Luteolina

Publicaciones como las realizadas por Erlund ¹⁷, Yan ¹⁸ o Mohamed ¹⁶ mencionan las principales plantas con alto contenido de luteolina, estos son: la cerilla, el brócoli, ají verde, pimienta verde y roja, cebolla, apio, porotos y zanahoria. En las frutas se encuentra en cantidades traza y en forma de glicósidos.

Estudios como los realizados por G. Sudhandiran,¹⁹ muestran efectos quimioprotectores contra tumores malignos in vivo sin efectos tóxicos colaterales, como también, propiedades anti-inflamatorias por medio de la inhibición de la producción de óxido nítrico, además de actuar como antioxidante debido a su alta eficiencia para atrapar radicales libres, protegiendo a las células de la peroxidación lipídica.

El uso efectivo de las geninas o también llamadas agliconas, está restringido por la baja solubilidad en medios acuosos, debido a su carácter apolar. Los flavonoides, al estar glicosilados - como se encuentran preferentemente en la naturaleza - los hace mas solubles, pero menos eficientes atrapando radicales libres. Dicho resultado, queda demostrado en el estudio realizado por S. Burda ²⁰ en que presenta el efecto de la glicosilación en la actividad antioxidante de los flavonoides analizados, en él se demuestra que la actividad antioxidante aumenta hasta un 60% en las agliconas,

comparado con su análogo glicosilado. Por esta razón, existen variadas técnicas que permiten mejorar esta baja solubilidad relativa, para así mejorar su biodisponibilidad. Una de estas estrategias corresponde al uso de ciclodextrinas, que se ha masificado en el último tiempo.^{21, 22, 23}

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son un grupo de oligosacáridos cíclicos producidos por acción enzimática sobre el almidón. Las más utilizadas, se componen por 6, 7 u 8 unidades de glucosa conectadas por enlaces glucosídicos α -(1,4) llamadas comúnmente como α , β y γ respectivamente, en la figuras 6 y 7 se presentan las estructuras químicas y las dimensiones geométricas aproximadas, respectivamente de cada una de las ciclodextrinas mencionadas.

La conformación en solución acuosa de las CDs se asemeja a un cono truncado. Por fuera de él, en torno al borde del lado ancho se encuentran los $-OH$ secundarios de C-2 y C-3; en torno al borde del lado angosto, se hallan los $-OH$ primarios de C-6, esto es, los grupos $-CH_2OH$. Debido a la alta presencia de estos grupos hidroxilo hidrofílicos en los extremos de la cavidad, es que las ciclodextrinas son solubles en agua. En el interior del cono, en cambio, existe un fuerte carácter hidrofóbico.

Estas características, son las que permiten a las CDs formar complejos de inclusión. La formación de dichos complejos, corresponde a un proceso de equilibrio dinámico que está determinada principalmente por interacciones hidrófobas, de Van der Waals, dipolo-dipolo, ión-dipolo, energía conformacional y el reordenamiento de moléculas de agua que originalmente circundan la ciclodextrina y la molécula huésped.²⁴

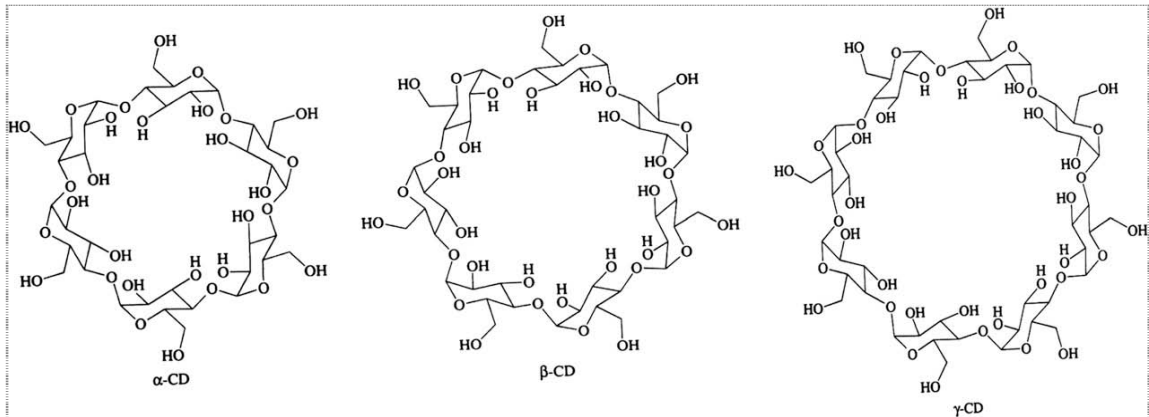


Figura 6: Estructuras químicas de α-CDs, β-CDs y γ-CDs.

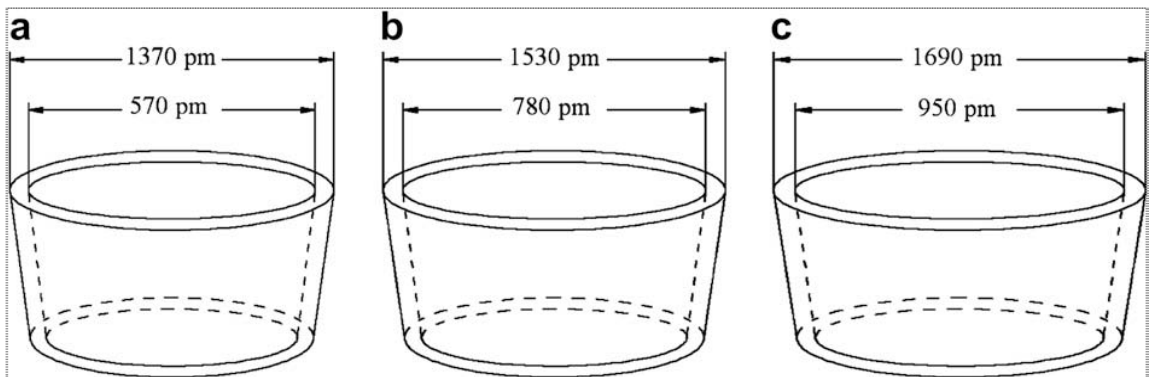


Figura 7: Dimensiones geométricas aproximadas de a)α-CDs, b)β-CDs, c)γ-CDs.

De este modo, moléculas de carácter hidrófobo - por ejemplo, moléculas con anillos aromáticos en su estructura-, debido a una mejor afinidad relativa con la cavidad interna de la CD, podrían formar complejos de inclusión más estables. Se ha demostrado que la formación de los complejos de inclusión puede incrementar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de la molécula hospedera.²⁵

Así es como la formación de complejos de inclusión, es una de las aplicaciones más conocidas de las ciclodextrinas, principalmente para el análisis espectroscópico, la separación cromatográfica, membranas en procesos de filtración y purificación, especialmente en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética.

Debido al carácter apolar de los sustratos a estudiar (geninas), y las características antes mencionadas de las ciclodextrinas, nos permite suponer la formación de complejos de inclusión, de esta forma, se esperaría mejorar la solubilidad del sustrato y, así su biodisponibilidad en el organismo.^{26,27}

Con los antecedentes ya presentados, en este trabajo se estudiará, en una primera instancia, la formación de complejos de inclusión de luteolina con tres CDs: β -CD, DM β -CD y HP β -CD. Se determinará la constante de asociación para los tres complejos de inclusión como también su estequiometría, parámetros que permiten inferir acerca de estabilidad de los complejos de inclusión.

Por otro lado, se evaluará su actividad antioxidante por medio de distintos métodos tanto para Luteolina en su estado libre como formando complejos de inclusión, tratando de dar respuestas a los resultados de capacidad antioxidante en función de la estructura química de los sustratos.

Los resultados de actividad antioxidante obtenidos para luteolina y sus complejos, serán comparados con los obtenidos para los siguientes flavonoides, presentados en la figura 8: apigenina, galangina y canferol con sus respectivos complejos de inclusión con ciclodextrinas.

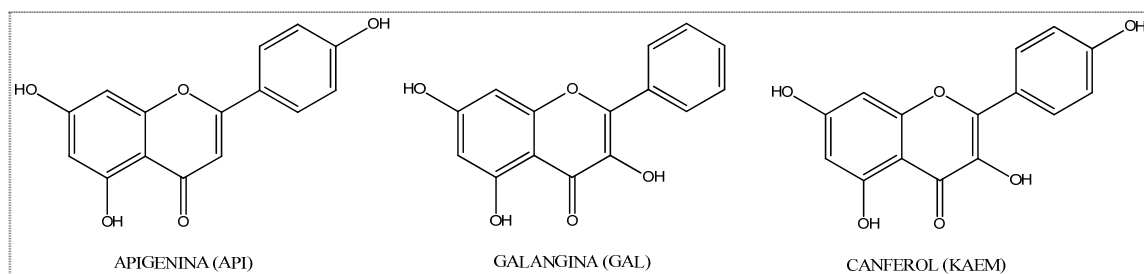


Figura 8: Estructuras químicas de API, GAL y KAEM.

HIPÓTESIS

Considerando el carácter apolar de luteolina y la presencia de anillos aromáticos en su estructura química, se espera que constituya un buen sustrato para la formación de complejos de inclusión en ciclodextrinas.

La inclusión podría mejorar sus propiedades fisicoquímicas, solubilidad en medios acuosos, reactividad y capacidad antioxidante.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la reactividad de luteolina en su estado libre, formando complejos de inclusión con diferentes ciclodextrinas, para finalmente comparar resultados con otros flavonoides.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Formación de los complejos de ciclodextrina-luteolina, utilizando: β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y 2,6 dimetil- β -ciclodextrina.
- 2.** Determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión ciclodextrina-luteolina mediante la metodología de variación continua (Job Plot).
- 3.** Determinación de la constante de asociación de los complejos de inclusión formados de: luteolina- β -ciclodextrina, luteolina-DM- β -ciclodextrina y luteolina-HP- β -ciclodextrina, mediante fluorescencia.
- 4.** Evaluar la actividad antioxidante de luteolina con sus complejos de inclusión con β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y 2,6 dimetil- β -ciclodextrina por medio de ORAC_{FL} y ORAC_{PGR}, DPPH y REE.
- 5.** Comparar y analizar la capacidad antioxidante obtenida por ORAC_{FL}, ORAC_{PGR} y DPPH de la luteolina tanto en su estado libre, formando complejos de inclusión y otros flavonoides como son: apigenina, galangina y canferol, con sus respectivos complejos de inclusión.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Los reactivos utilizados: luteolina (5, 7,3',4'-tetrahidroxiflavona) , apigenina (5,7 4'trihidroxiflavona) , canferol (3, 5, 7,4'-tetrahidroxiflavonol) , galangina (3,5,7-trihidroxiflavona) , β -ciclodextrina (β -CD) , 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) , Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- β -ciclodextrina (DM β -CD) , ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) , Sal disodio de 3',6'-dihidroxi-spiro [3H-isobenzofuran-1,9'-xanten]-3-ona, llamada comúnmente Fluoresceína (FL) , Rojo Pirogallol (PGR) , 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) , 2,6-Di-tert-butil- α -(3,5di-tert-butil-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-iliden)-p-toliloxi (Galvinoxil o GVX) , 5,5-dimetil-1-pirrolin N-oxido (DMPO), 2,2'-azobis(2-methylpropionamida) (ABAP), fueron obtenidas de Sigma-Aldrich.

EQUIPOS

Baño termostático con agitación recíproca. Modelo DKZ-2, N° L-512309. Hi-Tech Instrument.

Espectrofotómetros de absorción molecular (UV-VIS): Jenway 6405 y Agilent 8453 (Palo Alto, CA, USA).

Espectrofluorímetro: Perkin Elmer LS-50 (Nowalk, CT, USA)

Espectrofotómetro de absorción molecular (UV-VIS) y Espectrofluorímetro acoplados: Equipo de multidetección microplato Synergy HT, de BioTek Instruments, Inc. (Winooski, VT), se utilizaron microplacas de poliestireno.

Resonancia Espín Electrónico (REE) Espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9.8 GHz) con cavidad rectangular y 50 GHz de modulación de campo.

METODOLOGÍAS

1. PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Los complejos de inclusión flavonoide – ciclodextrina se prepararon a razones molares 1:3 en solución tampón fosfato pH 7.4 con un 10% de MeOH. La solución se mantuvo con agitación continua a 120 rpm a temperatura controlada (30° C) durante 24 horas, período de tiempo requerido para que los complejos alcancen el equilibrio.

2. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN

El método de variación continua permite determinar la estequiometría de un complejo de inclusión. Dicho método consiste en medir la diferencia de un parámetro físico, como es la absorbancia, que está relacionado directamente con la concentración, en función de la fracción molar de uno de los componentes del complejo de inclusión.²⁸

La formación del complejo de inclusión para un sustrato (S) con ciclodextrina (CD), de estequiometría desconocida (n), se describe de acuerdo a la siguiente ecuación:



Luego se calcularon los valores de:

$$\Delta A = A_0 - A \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Donde:

A₀: Absorbancia del sustrato libre

A: Absorbancia en presencia de ciclodextrinas.

Posteriormente se graficó $\Delta A \times [S]$ en función de la fracción molar del sustrato r . $\{r = [S]_t / ([S]_t + [CD]_t)\}$, donde $[S]$ corresponde a la concentración de sustrato.

El valor estequiométrico del complejo n , está dado por el valor máximo de r en el gráfico de variación continua, con:

$$r = (n+1)^{-1} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Condiciones de trabajo:

Se prepararon soluciones stock equimolares de LU y CDs solubilizadas en MeOH: Buffer (1:9). A continuación, se prepararon complejos con razones molares r , desde 0,1 hasta 0,9 manteniendo una concentración total constante de 1×10^{-4} M.

3. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ASOCIACIÓN

Ensayos fluorimétricos previos, revelan que las señales se intensifican con el aumento de la concentración de CDs ²¹. El aumento de la intensidad de fluorescencia se debe a la formación del complejo de inclusión entre el sustrato y CDs. La formación de un complejo de inclusión 1:1 y su respectiva constante de asociación K_a se puede expresar mediante la siguiente ecuación química y:



La constante de asociación se puede calcular mediante la ecuación de Benesi-Hildebrand modificada ²⁹:

$$\frac{1}{F_i - F_0} = \frac{1}{K_a \cdot \alpha} \cdot \frac{1}{[CD]} + \frac{1}{\alpha} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde:

F_i: Intensidad de fluorescencia del complejo de inclusión.

F₀: Intensidad de fluorescencia de la molécula hospedera en ausencia de CDs.

K_a: Constante de asociación formada.

α: Constante instrumental.

[CD]: Concentración de la ciclodextrina.

De este modo, realizando el gráfico de dobles recíprocos: 1 / (F-F₀) en función de 1 / [CD] se calcularon las constantes de asociación a partir de la pendiente y el intercepto de la curva lineal obtenida.

Condiciones de trabajo:

Se prepararon los complejos de inclusión en una mezcla MeOH: Buffer (1:9) a concentración constante de LU de 1x10⁻⁵ M y concentraciones crecientes de CDs desde 0 hasta 1,5 mM. Se usa una longitud de onda de excitación de 370 nm.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

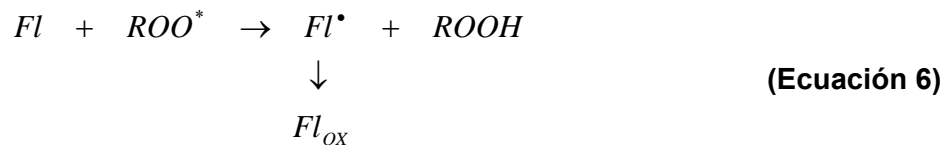
Ensayos ORAC:

Las técnicas ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), han sido ampliamente utilizadas para testear la reactividad y/o la capacidad de atrapar radicales libres que presentan diversos antioxidantes (AH). En estos métodos, se evalúa el modo en que protege el sustrato agregado (AH) una determinada sustancia que es utilizada como sonda, al ser expuesto a una fuente controlada de radicales libres. Para ello, se requieren los siguientes prerequisites:

- Tener control de la velocidad de producción de los radicales libres, esto se logra determinando la concentración y la temperatura de la reacción.
- Que la degradación de la molécula sondeada producto de la acción de los radicales libres, sea fácilmente evaluada.

a) **Ensayos ORAC_{FL}**

Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizó la técnica ORAC_{FL}, que permite medir el efecto relativo de un antioxidante sobre especies reactivas de oxígeno (EROs), descrito por E. Nuñez- Delicado et al ³⁰. Esta metodología se basa en la inhibición del radical peroxilo inducida por la descomposición térmica de azo-compuestos (AAPH). Los radicales oxidan la fluoresceína, molécula sonda, produciendo una especie no fluorescente como se presenta en la ecuación 6:



Inicialmente se midieron las cinéticas de decaimiento de la fluorescencia, luego se calculó el área bajo la curva de (F/F₀) en el tiempo, tanto para Trolox que se utiliza como estándar, como para los antioxidantes evaluados.

Se confeccionaron las curvas de área bajo la curva (ABC) en función de la concentración de antioxidante. La pendiente de la curva lineal de dichas curvas define los valores de ORAC, determinados a partir de la siguiente fórmula:

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} \times \frac{[Trolox]}{[AH]} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Donde:

ABC_{AH}: Área bajo la curva en presencia de antioxidante.

ABC_{Trolox}: Área bajo la curva de Trolox.

[Trolox]: Concentración de Trolox.

[AH]: Concentración de Antioxidante.

El valor de ORAC se expresa en equivalentes de trolox (T_{EQ}), que indican la capacidad antioxidante en relación al estándar trolox que posee un valor de 1,0 T_{EQ}.

Por otro lado, con el objetivo de clarificar los resultados obtenidos en capacidad antioxidante medido por ORAC_{FL}, se calculó la concentración de flavonoide libre ([LUT]_f) para cada una de las muestras medidas por el método de acuerdo a la ecuación 8, descrita por E. Núñez-Delicado et al ³¹.

$$[LUT]_f = \frac{-([CD]_t \cdot K_a - [LUT]_t \cdot K_a + 1) + \sqrt{([CD]_t \cdot K_a - [LUT]_t \cdot K_a + 1)^2 + 4 \cdot K_a \cdot [LUT]_t}}{2 \cdot K_a}$$

(Ecuación 8)

Donde:

[LUT]_t: concentración molar de flavonoide total.

[CD]_t: concentración molar de CD total.

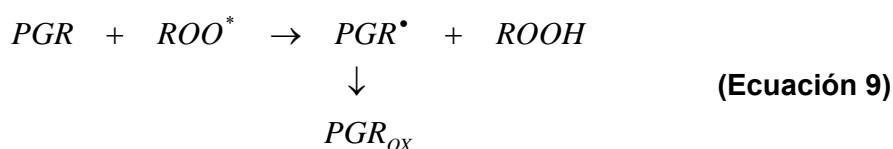
K_a: Constante de Asociación.

Condiciones de trabajo:

La fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 520 nm. La reacción se lleva a cabo en buffer fosfato 75mM a pH 7,4, con un volumen final de 200µL. En la celda microplaca se colocan las siguientes soluciones para la mezcla de reacción final: 150 µL de FL de concentración 8 nM, 25 µL de antioxidante en presencia o ausencia de ciclodextrina, y 25 µL de ABAP de concentración 150 mM. La mezcla se preincuba durante 15 min a 37°C, las cinéticas de reacción se llevaron a cabo a temperatura constante de 40°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

b) Ensayos ORAC_{PGR}

Se evaluó la capacidad antioxidante mediante la técnica ORAC, metodología descrita por C. López- Alarcón & E. Lissi³² en que se usa como molécula sonda PGR. Se ha observado, que concentraciones relativamente altas de PGR presentan dos ventajas sustanciales frente a las metodologías clásicas de ORAC: por un lado resulta una mejor correlación con la reactividad de los compuestos testeados y; por otro se utiliza espectrofotometría para seguir el decaimiento de la molécula sonda. Esta metodología, se basa en la inhibición del radical peroxilo que oxidan al PGR produciendo su apagamiento, de acuerdo a lo descrito en la ecuación 9:



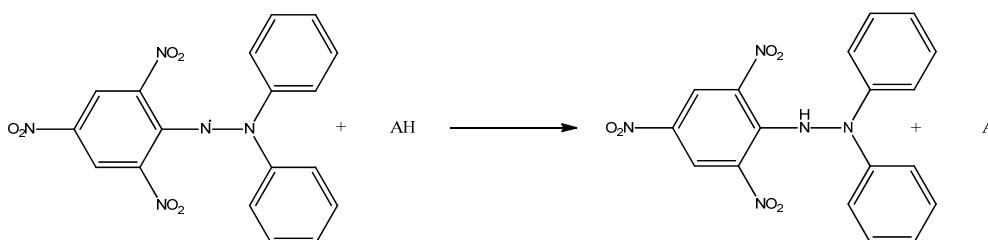
Se registró el decaimiento de la absorbancia en el tiempo, mediante ensayos espectrofotométricos. Todos los pasos siguientes coinciden con los anteriormente descritos para la metodología ORAC_{FL}.

Condiciones de trabajo:

Se midió la absorbancia a una longitud de onda fija de 540 nm. La reacción se llevó a cabo en buffer fosfato 75mM a pH 7,4, con un volumen final de 200µL. En la celda microplaca se colocan las siguientes soluciones para la mezcla de reacción final: 150 µL de PGR de concentración final de 40µM, 25 µL de antioxidante en presencia o ausencia de ciclodextrina, y 25 µL de ABAP de concentración final 10 mM. La mezcla se preincuba durante 15 min a 37°C, las cinéticas de reacción se llevaron a cabo a temperatura constante de 40°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

c) Evaluación de la actividad antioxidante con DPPH

Se realizaron las medidas de actividad antioxidante evaluando el consumo del radical estable DPPH mediante ensayos espectrofotométricos, de acuerdo al método descrito por D.Villaño et al³³ con algunas modificaciones. Dicho radical reacciona con el antioxidante produciendo el DPPH-H tal como se presenta en la ecuación 10. Esta técnica es una de las pruebas más simples y rápidas para evaluar la actividad del antioxidante frente a radicales libres.



(Ecuación 10)

DPPH es un radical estable centrado en nitrógeno, por esta razón no tiene significancia biológica. Sin embargo nos permite conocer -en términos generales - la reactividad de los flavonoides y sus respectivos complejos de inclusión.

La reacción se inicia con la adición de la solución de antioxidante sobre la de DPPH, registrando en forma continua la disminución de la absorbancia. Se obtienen las cinéticas de decaimiento las que posteriormente son normalizadas. Luego, dichas curvas se ajustan a un modelo de decaimiento exponencial de tercer orden de acuerdo a la ecuación 11:

$$y = A_1 \cdot e^{-x/t_1} + A_2 \cdot e^{-x/t_2} + A_3 \cdot e^{-x/t_3} + y_0 \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Una vez establecido el ajuste para cada decaimiento, se procede a derivar el ajuste realizado en función del tiempo. A partir de la curva diferencial se obtiene el valor de $y_{x=0}$. El valor absoluto de y cuando $x=0$ se multiplica por la concentración de antioxidante, de este modo, se obtiene el valor de la velocidad inicial, la cual puede ser comparada con otras velocidad iniciales a una concentración constante.

Por otra parte, se realizó un estudio para calcular el número de hidrógenos lábiles de cada compuesto analizado, a partir de la confección de un gráfico del logaritmo de las velocidades iniciales en función del logaritmo de las concentraciones utilizadas en cada curva de decaimiento, la pendiente del ajuste lineal – de acuerdo a la ecuación 12- indica teóricamente la cantidad de átomos de hidrógeno que estaría cediendo cada molécula de flavonoide al reaccionar con las moléculas de radical DPPH.

$$\text{Log}(V_i) = \text{Log}(V) + n \text{Log}([AH]) \quad \text{(Ecuación 12)}$$

Condiciones de trabajo:

Se preparó una solución de DPPH[•] en metanol de concentración final de 50 μ M. Se agrega sobre dicha solución, una solución metanólica de antioxidante en rangos de concentración de 10 hasta 200 η M. La absorbancia se midió continuamente a 515 nm a temperatura ambiente, se registraron los datos a intervalos de 0,5 segundos durante 70 segundos de reacción, lapso de tiempo requerido para la estabilización de la reacción. Cabe notar, la altísima velocidad de las reacciones, es por ello que para realizar un buen registro del decaimiento de la absorbancia en el tiempo, es necesaria agitación constante.

***d)* Resonancia de Espín Electrónico**

Se evaluó la actividad antioxidante de los flavonoides y sus complejos de inclusión, mediante la determinación del apagamiento de radicales libres por Resonancia Espín Electrónico (REE). La REE es una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados esencialmente cualitativa, en este estudio se utilizó para detectar radicales libres conocidos y evaluar la reactividad - capacidad de atrapamiento de radicales - de LU y sus complejos de inclusión, evidenciado en la disminución de las señales espectroscópicas debido a la ausencia relativa de sustancias paramagnéticas producto de la reacción.

➤ **Determinación de la actividad antioxidante por apagamiento de radical DPPH**

Se evaluó la actividad antioxidante de Luteolina y sus complejos de inclusión mediante el consumo de radical DPPH.

Se preparó una solución stock del radical estable DPPH de 10mM en metanol, se realizaron las mezclas de reacción a un volumen final de 200µL, adicionando 25µL de la solución stock de DPPH para todas las muestras. La concentración final de DPPH en el medio de reacción es 1mM y se agregan 100µL de solución de antioxidante en metanol según sea el caso.

Se registró la señal en REE a 1 minuto de iniciada la reacción. La actividad antioxidante de las muestras se evalúa por comparación del área bajo la curva del espectro obtenido de cada muestra antioxidante con el blanco.

Los datos se expresan en porcentaje de radical remanente, calculados mediante:

$$\% R^{\bullet} rem = \left[\frac{A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \right] \times 100 \quad \text{(Ecuación 13)}$$

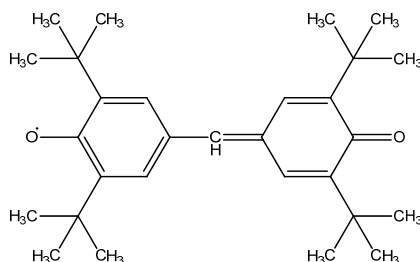
Donde:

$A_{C(0)}$: Absorbancia inicial de la solución DPPH a tiempo = 0

$A_{A(t)}$: Absorbancia final de la solución DPPH a tiempo = t.

➤ **Determinación de la actividad Antioxidante por apagamiento de radical Galvinoxil**

Se evaluó la actividad antioxidante de luteolina y sus complejos de inclusión mediante el consumo de radical GVX.



Se preparó una solución stock del radical estable GVX de 10mM en metanol. Se realizaron las mezclas de reacción a un volumen final de 200 μ L, adicionando 25 μ L de la solución stock de GVX para todas las muestras preparadas. La concentración final de GVX en el medio de reacción es 1mM y se agregan 100 μ L de solución de antioxidante en metanol según sea el caso.

Se registra la señal en REE a 1 min aproximadamente iniciada la reacción. La actividad antioxidante de las muestras se evalúa por comparación del área bajo la curva del espectro obtenido de cada muestra antioxidante con el blanco. Los datos se expresan en porcentaje de radical remanente, tal como se ha presentado de acuerdo a la ecuación 13.

➤ **Determinación de la actividad Antioxidante mediante Spin-trapping**

La espectroscopía de REE es una técnica adecuada para caracterizar radicales libres con tiempos de vida media “medibles”, es decir, que se alcance a registrar durante el desarrollo de los espectros.

Como sabemos, los radicales libres son - en general - sustancias de corta vida relativa. Para radicales que tienen vidas medias muy cortas, se utilizan los Spin-Trap, que son especies diamagnéticas o también llamadas ESR silentes. Dichas especies, son compuestos que reaccionan con radicales libres de corta vida, como por ejemplo el radical OH^\bullet , formando Spin-Aductos estables, es decir, forman un radical mas persistente, que hace posible caracterizar la presencia de sustancias paramagnéticas, deduciendo en forma indirecta el radical atrapado por el Spin-Trap.

En este caso, se midió el radical OH^\bullet debido a su alto interés biológico producto de su alta reactividad. Para ello se generó el radical hidroxilo mediante un método no catalítico, en que se utilizó como Spin-Trap: DMPO (figura 9) para atrapar el radical generado. La mezcla de reacción debe contener $100\mu\text{L}$ H_2O_2 al 30%, $75\mu\text{L}$ de NaOH 25mM, $75\mu\text{L}$ de DMPO 1mM y $50\mu\text{L}$ de muestra antioxidante. Los datos se expresan en porcentaje de radical remanente.

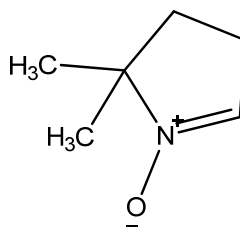


Figura 9: Estructura química DMPO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CICLODEXTRINA-LUTEOLINA

La estequiometría de los complejos de inclusión para luteolina con las ciclodextrinas utilizadas, fue determinada por medio del método de variación continua, Job Plot.

Se realizó el diagrama presentado en la figura 10, que relaciona la diferencia de absorbancia (ΔA) por la concentración de Luteolina en el complejo ([LUT]) en función de la fracción molar de LUT en el complejo, para cada una de las ciclodextrinas estudiadas: β CD, DM β -CD y HP β -CD. En dicho diagrama se observa el máximo a 0,5 para los tres casos lo que implica que todos los complejos tienen una estequiometría 1:1 de acuerdo a la ecuación 3.

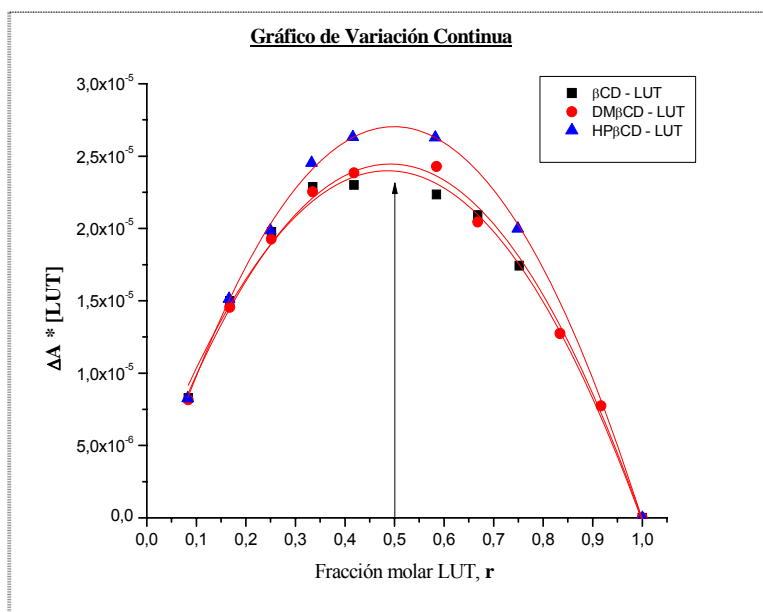


Figura 10: Gráfico de variación continua para complejos de LUT con β -CD, DM β -CD y HP β -CD.

De acuerdo a los datos obtenidos a través de éste método, es posible expresar el equilibrio del proceso de inclusión de CD- LUT por medio de la ecuación 1 con n, el factor estequiométrico igual a 1.

Con los resultados obtenidos, además de determinar la estequiometría, se comprueba indirectamente la formación de los complejos de inclusión para las tres ciclodextrinas evaluadas.

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ASOCIACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Se determinaron los valores de las constantes de asociación mediante el método de Benesi-Hildebrand descrito en Materiales y Métodos utilizando la espectroscopía de Fluorescencia.

Se obtuvieron los espectros de fluorescencia, presentados en la figura 11, en que se observa que la intensidad de las señales aumenta, a medida que aumentan las concentraciones de CDs, esto podría implicar la formación de complejos estables entre LUT y las CDs estudiadas.

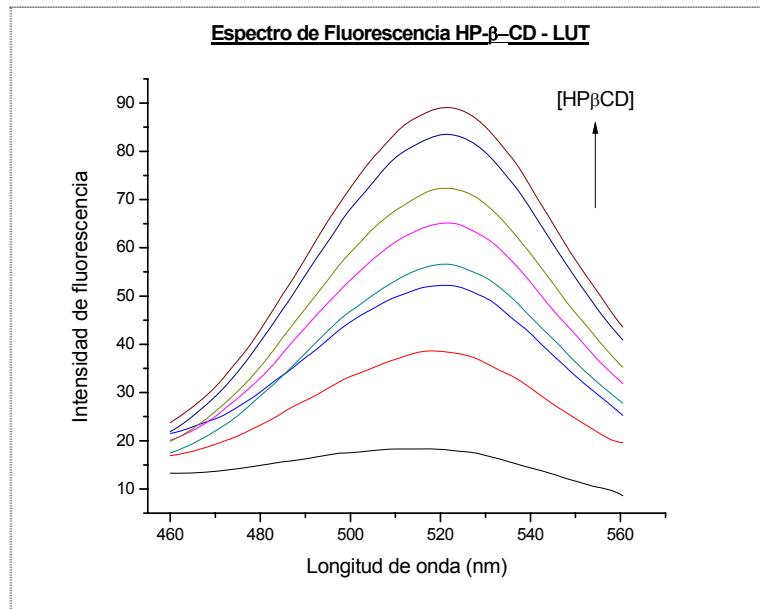


Figura 11: Espectro de Fluorescencia de LUT y sus complejos de inclusión con HPβ-CD (concentración constante de LUT de 0,01mM y concentración de CD de desde 0,03 hasta 1mM).

En la figura 12 se muestra el gráfico de dobles recíprocos, es decir, el inverso de la diferencia de los máximos de fluorescencia, en función del inverso de la concentración de CD para cada uno de los complejos de inclusión estudiados, de acuerdo a la ecuación 5. Se observa que para todos los casos se ajusta a una curva lineal, lo que confirma la estequiometría 1:1, dato previamente comprobado de acuerdo al método de variación continua.

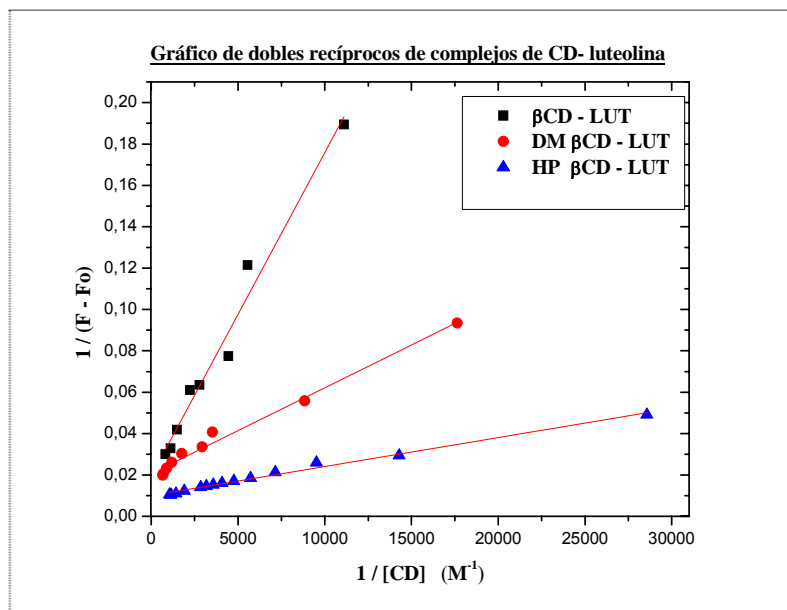


Figura 12: Gráfico del inverso de la intensidad de fluorescencia en función del inverso de la concentración de CD para complejos de inclusión de LUT con β -CD ($r^2 = 0,975$), DM β -CD ($r^2 = 0,985$) y HP β -CD ($r^2=0,989$).

Se calcularon los valores de las constantes de asociación para cada complejo de inclusión formado por triplicado, a partir de la pendiente e intercepto de las curvas obtenidas de la figura 6, las que se presentan en la tabla 1.

	β CD [M ⁻¹] \pm SD	DM β CD [M ⁻¹] \pm SD	HP β CD [M ⁻¹] \pm SD
Constante de asociación	1263 \pm 15	4885 \pm 170	7124 \pm 163

Tabla 1: Constantes de Asociación obtenidas para los complejos de inclusión de LUT con β -CD, HP β -CD y DM β -CD.

Se observa la tendencia creciente de los valores de las constantes de asociación de: HP β CD > DM β CD > β CD. Esto se puede explicar a partir de las mayores interacciones posibles de HP β CD y DM β CD con LUT, debido a las sustituciones adicionales de 2-hidroxipropil y dimetilos respectivos, comparados con la ciclodextrina nativa. Por tanto, las ciclodextrinas derivatizadas suministran una mayor superficie disponible de interacción con el flavonoide, lo que se expresa en una mayor asociación relativa.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LUTEOLINA Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

a) ORAC_{FL}

Para evaluar la capacidad antioxidante de LUT y sus complejos de inclusión formados con las diferentes CDs se utilizó la técnica ORAC-Fluoresceína (ORAC_{FL}).

Para determinar dichos valores es necesario realizar una curva de calibración para Trolox (figura 13), que corresponde al análogo soluble de la vitamina E, y se utiliza generalmente como parámetro de comparación para los valores de ORAC.

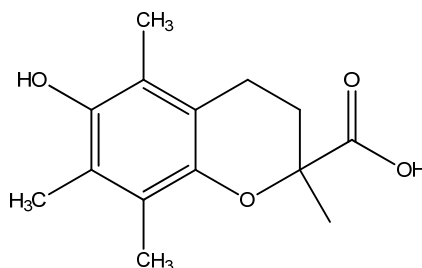


Figura 13: Estructura química de Trolox

En la figura 14, se observan las curvas de decaimiento de la fluoresceína en el tiempo a diferentes concentraciones de antioxidante. Una característica de las curvas de decaimiento de fluoresceína, es el llamado plató inicial que corresponde a un tiempo de inducción asociado a la reacción, que se ve acentuado a medida que aumenta la concentración del antioxidante.

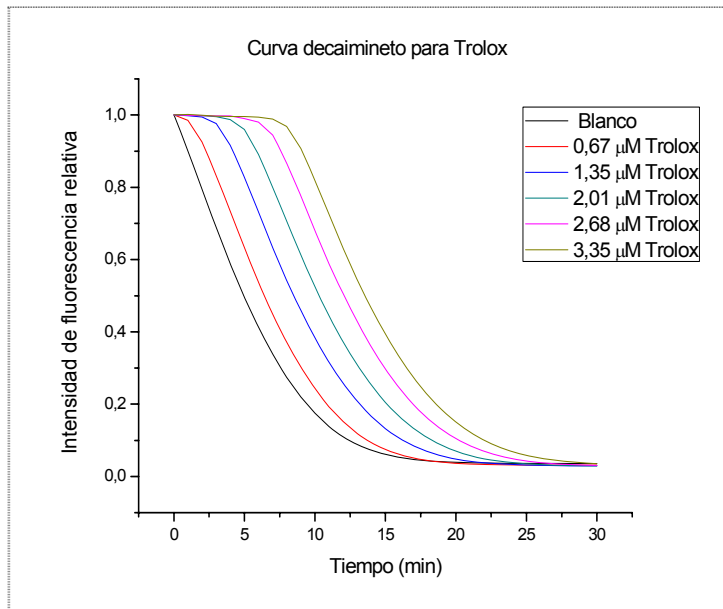


Figura 14: Perfiles cinéticos de consumo de FL inducidos por AAPH en presencia de Trolox a diferentes concentraciones.

Posteriormente, se calculó el área bajo la curva (ABC neta = ABC muestra- ABC blanco) para cada una de las curvas de decaimiento, y se realizó un gráfico de estos valores de área en función de la concentración de antioxidante utilizado, dicho gráfico se presenta en la figura 15. Los valores de la pendiente de los gráficos de ABC neta en función de la concentración de antioxidante, son los que se relacionan según la ecuación 7 para determinar los valores de Trolox Equivalentes (T_{EQ}).

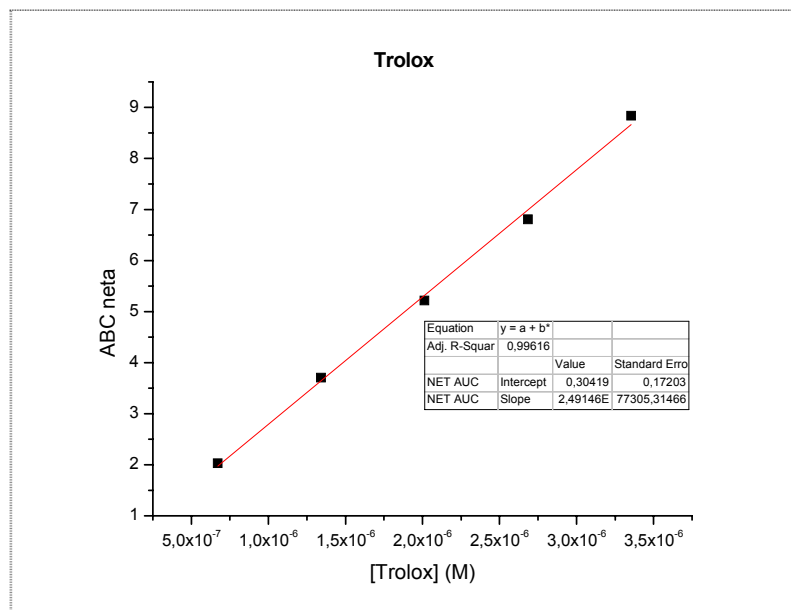


Figura 15: Regresión lineal de ABC neta de Trolox a diferentes concentraciones de Trolox (desde 0,67 μM hasta 3,35 μM). ABC neta = ABC muestra – ABC blanco.

Por otro lado, se midieron las curvas de decaimiento de fluoresceína y se realizó la respectiva confección de las curvas del área bajo la curva, en función - esta vez - de la concentración para LUT y sus respectivos complejos de inclusión con las diferentes CDs. A modo de ejemplo, se presentan en la figura 16 el decaimiento en el tiempo observado para luteolina y ABC neta en función de la concentración de flavonoide. En la tabla 2 se presentan las pendientes promedio, los coeficientes de correlación obtenidos de dichos ajustes lineales, además de los valores de T_{EQ} correspondientes a cada antioxidante evaluado por triplicado.

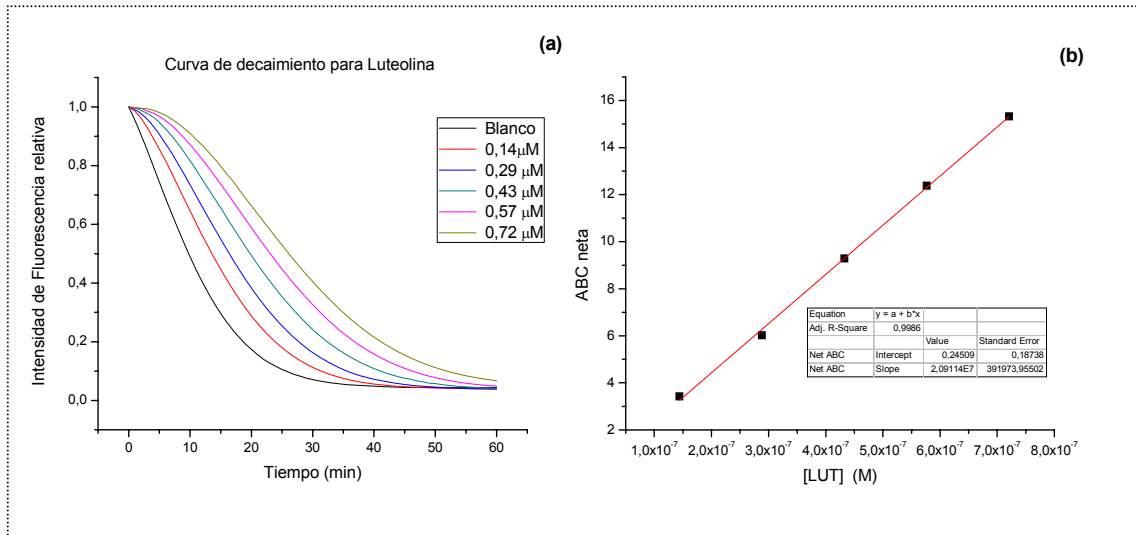


Figura 16: (a) Perfiles cinéticos de consumo de FL inducidos por AAPH en presencia de LUT a diferentes concentraciones. (b) Regresión lineal de ABC neta de LUT a diferentes concentraciones (desde 0,14μM hasta 0,72 μM).

	Pendiente	r²	T_{EQ}
	PROMEDIO	PROMEDIO	
Trolox	2,64x10 ⁶	0,992	1
Luteolina	2,12 x10 ⁷	0,996	8,00 ± 0,20
β- Luteolina	2,21 x10 ⁷	0,988	8,34 ± 0,15
DM-β- Luteolina	2,42 x10 ⁷	0,993	9,14 ± 0,36
HP-β- Luteolina	2,38 x10 ⁷	0,976	8,99 ± 0,37

Tabla 2: Valores promedio de las pendiente de las curvas de regresión ABC neta, en función de la concentración, con su respectivo valor de coeficiente de correlación y el valor de T_{EQ} para LUT y sus complejos de inclusión con β-CD, HPβ.-CD y DMβ-CD.

Con los datos de concentración de flavonoide y CD en el complejo, junto con los valores de las constantes de asociación determinadas previamente en este trabajo, se calcularon y se presentan en la tabla 3, la concentración de LUT libre con cada una de las CDs evaluadas.

	K_a	% LUT _f mM	
		0 mM CD	1mM CD
β- Luteolina	1263	100	38,1
DM-β- Luteolina	4885	100	14,7
HP-β- Luteolina	7124	100	11,3

Tabla 3: K_a : constante de Asociación determinado por Benesi-Hildebrand y % de LUT libre concentración de LUT libre para cada complejo de inclusión.

A partir de los resultados presentados se puede inferir que:

- En términos generales, de acuerdo a la tabla 2, no existen variaciones en la capacidad antioxidante ya que tomando en cuenta la desviación estándar, las diferencias no son significativas. Por lo tanto, la capacidad antioxidante evaluada para LUT libre no cambia al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, para el caso de la capacidad antioxidante para βCD-LUT presentado en la tabla 2, los resultados en T_{EQ} son especialmente similares a LUT en su estado libre. Además, la constante de asociación es más baja ($1263 \pm 15 \text{ M}^{-1}$), comparada con las constantes determinadas para los otros complejos de inclusión. Por lo tanto, existe un porcentaje cercano al 40% en moles de luteolina libre, a partir de los resultados teóricos presentados en la tabla 3, que no esta formando el complejo de inclusión y que se mide como tal, por ésta razón está incluido en el valor de $ORAC_{FL}$ correspondiente aparentemente a la capacidad antioxidante de dicho complejo de inclusión.

b) ORAC PGR

Se evaluó la capacidad antioxidante de LUT y sus complejos de inclusión por medio de la técnica $ORAC_{PGR}$, utilizando como sonda PGR. Al igual que en el procedimiento anterior, se midió el decaimiento – pero ésta vez- en la absorbancia de PGR, usando como aditivo Trolox, y se realizó la gráfica de ABC neta en función de la concentración, ambos presentados en la figura 17.

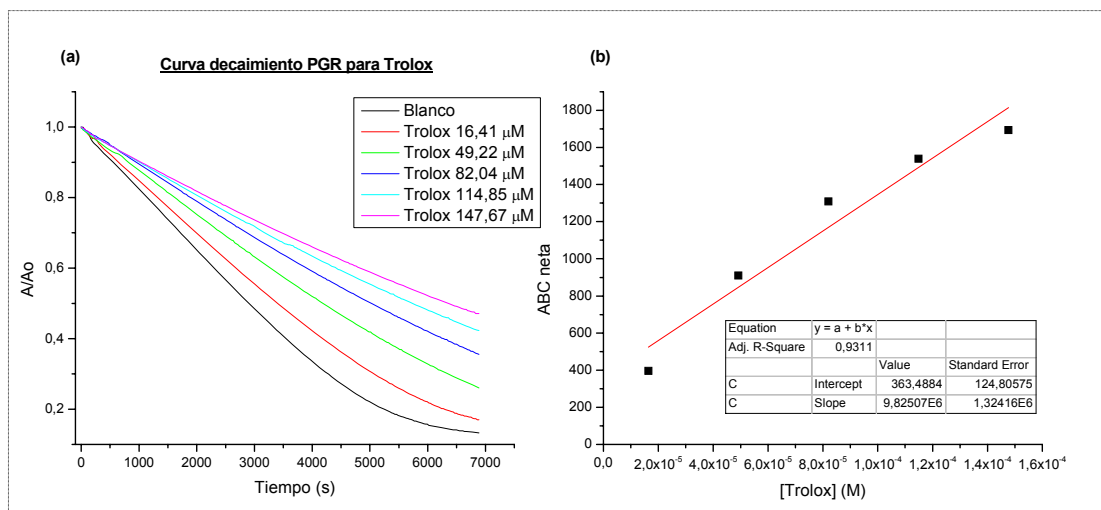


Figura 17: (a) Perfiles cinéticos de consumo de PGR inducidos por AAPH en presencia de Trolox a diferentes concentraciones. (b) Regresión lineal de ABC neta de Trolox a diferentes concentraciones de Trolox (desde 16,4 μM hasta 142 μM).

Es fundamental notar las diferencias de las curvas de decaimiento obtenidas en la figura 14 y la figura 17, ambas para Trolox. En primer lugar, se observa el plató inicial para el caso de fluoresceína asociado a un tiempo de inducción, que no se observa para el decaimiento de PGR. Esto sugiere, que para el caso de PGR existe una importante fracción de radicales peroxilo, que además de reaccionar con Trolox, reaccionan directamente con el PGR.

Con el objeto de explicar las diferencias producidas para cada decaimiento, en la tabla 4 se presentan las reacciones de acuerdo a los modelos cinéticos

simplificados, que permiten describir las oxidaciones competitivas de PGR y FL inducidas por los radicales peroxilo - producto de la termólisis del ABAP - para cada una de las metodologías ORAC analizadas. En dicha tabla, se muestran las constantes de velocidad \tilde{k}_1 y \tilde{k}_2 asociadas a las reacciones (1) en ausencia de antioxidante (blanco) y (2) en presencia de antioxidante, respectivamente.

En el caso de $ORAC_{FL}$ en presencia de antioxidante representada por \tilde{k}_2 FL en la ecuación (2) de la tabla 4 - utilizando el mismo ejemplo de Trolox -, se observa en la figura 14 un claro tiempo de inducción, esto permite suponer que no existe una competencia importante entre el antioxidante y la fluoresceína por atrapar los radicales presentes. Esto se debe a que los radicales peroxilo antes que todo, reaccionan totalmente con el antioxidante adicionado para luego, dichos radicales que están en exceso, reaccionan con la fluoresceína, que es la molécula sonda, evidenciado en el decaimiento de la fluorescencia. Este proceso se expresa, en términos de la constante de velocidad, que \tilde{k}_1FL es comparativamente, mucho menor que la constante de velocidad \tilde{k}_2 FL.

En el caso de $ORAC_{PGR}$, al adicionar antioxidante como por ejemplo Trolox, se observa una respuesta positiva distinta al blanco, representada por la ecuación (2) en la tabla 4, que tiene asociada su respectiva constante de velocidad \tilde{k}_2 PGR. A partir de la figura 17, se observa un decaimiento constante de la absorbancia, del que se puede inferir que existe una competencia entre Trolox y PGR para atrapar los radicales peroxilo. Esto permite suponer, que para el caso del antioxidante Trolox, la constante de velocidad \tilde{k}_1 PGR es comparativamente menor que la constante de velocidad \tilde{k}_2 PGR.

$ORAC_{PGR}$	$ORAC_{FL}$
--------------	-------------

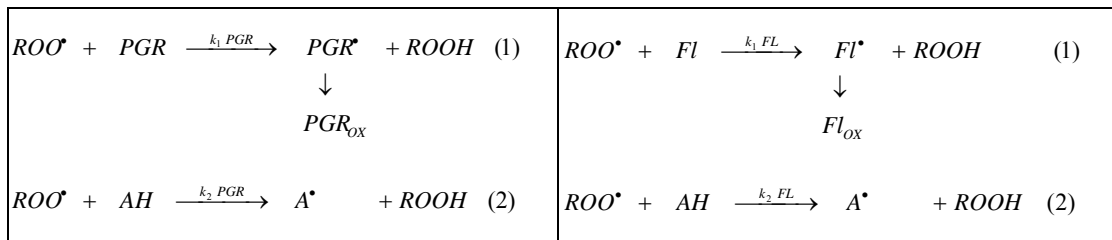


Tabla 4: Modelos cinéticos simplificados para describir las oxidaciones competitivas de las moléculas sonda PGR y FL con k_1 y k_2 constantes de velocidad asociadas a cada reacción química, inducidas por el radical peroxilo para las metodologías ORAC_{PGR} y ORAC_{FL}, respectivamente.

Es por ésta razón, que se dice que en ensayos de ORAC_{FI} existe una respuesta estequiométrica, dado que el radical, reacciona con todos los protones lábiles del antioxidante, para después reaccionar con la fluoresceína. Por otro lado, para el caso de ORAC_{PGR}, la respuesta obtenida se encuentra asociada a la reactividad del compuesto evaluado, ya que existe una competencia entre el PGR y el antioxidante. Estas diferencias se evalúan en función de la velocidad inicial de consumo, es decir, la pendiente inicial aproximada en cada curva de decaimiento. Si el decaimiento es lento - la pendiente de la curva de decaimiento en el tiempo es menor -, lo que implicaría que el aditivo interacciona más rápido con los radicales, que lo que éstos reaccionarían con PGR.

Posteriormente, se midieron las curvas de decaimiento de PGR utilizando como antioxidante luteolina y sus respectivos complejos de inclusión para las diferentes CDs. A modo de ejemplificar el tipo de decaimiento de PGR obtenido, se presenta la figura 18, el decaimiento para LUT en su estado libre.

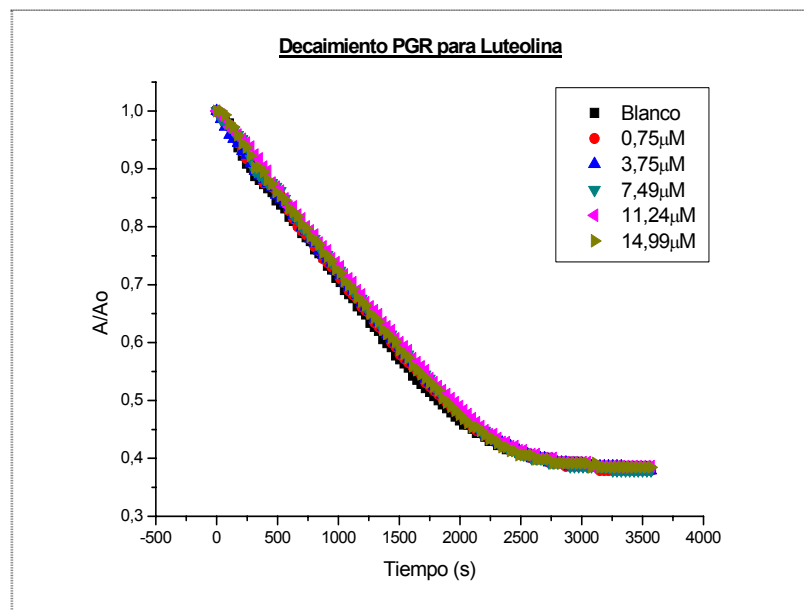


Figura 18: Perfiles cinéticos de consumo de PGR inducidos por AAPH en presencia de LUT a diferentes concentraciones.

En los ensayos realizados de $ORAC_{PGR}$, no se observan cambios en el ABC de las cinéticas de absorbancia en función del tiempo frente al aumento de las concentraciones de luteolina libre. El mismo resultado negativo se obtuvo para la evaluación de la reactividad de los complejos de inclusión de LUT con ciclodextrinas. De lo cual, se puede inferir que ninguno de los antioxidantes evaluados (LUT y sus complejos de inclusión con CDs) protegen al PGR, es decir, no son lo suficientemente reactivos como para competir con PGR frente a los radicales peroxilo en las condiciones experimentales presentadas. Esta respuesta, respecto de la baja reactividad de LUT, se puede deber a la ausencia de la sustitución de hidroxilo en la posición 3, que tampoco se ve favorecida al estar formando complejos de inclusión con CDs. Cabe notar, que no sucede lo mismo con Trolox, en que si se observa una clara respuesta positiva respecto de la protección de PGR, su alta reactividad se puede explicar producto de la presencia de grupos hidroxilos, los que proporcionan hidrógenos lo suficientemente reactivos como para atrapar los radicales peroxilo.

c) Atrapamiento radical DPPH mediante UV-VIS

Se determinó la actividad antioxidante del flavonoide LUT y sus complejos de inclusión con CD mediante el consumo del radical estable DPPH. La respuesta en este caso depende necesariamente de los hidrógenos lábiles presentes en el antioxidante

En la figura 19 se presenta la desaparición de DPPH[•] producto del atrapamiento por luteolina en el espectro de absorbancia.

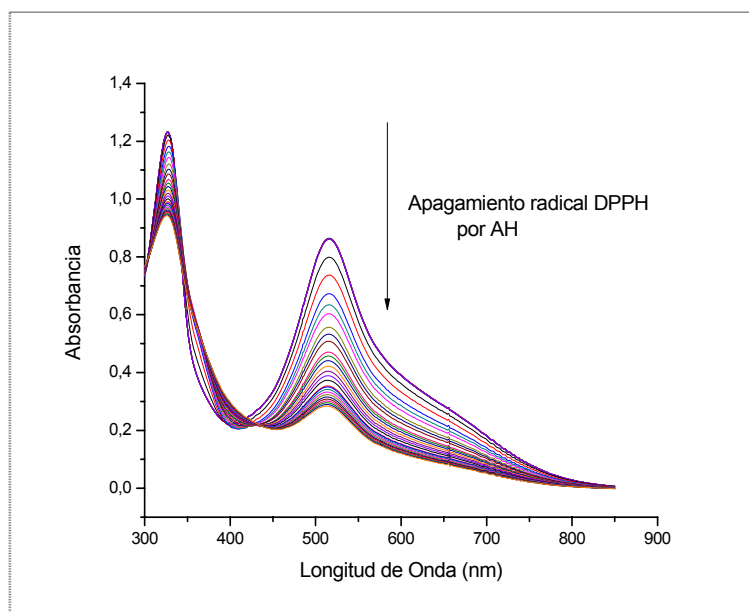


Figura 19: Apagamiento de DPPH[•] (50 μ M) por LUT 15 μ M entre 0 y 20 segundos de reacción.

Se registraron las cinéticas de decaimiento en la absorbancia, tanto para LUT en su estado libre y formando complejos de inclusión con CDs, a modo de ejemplo se presenta en la figura 20 el apagamiento DPPH por LUT.

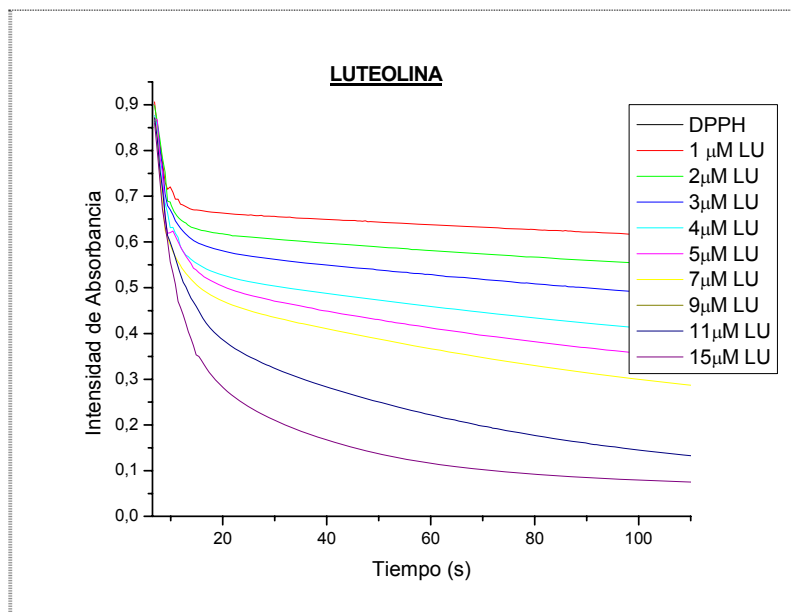


Figura 20: Cinética de decaimiento del radical DPPH por Luteolina a diferentes concentraciones.

En la tabla 5 siguiente, se presentan los valores obtenidos de velocidad inicial para LUT y sus complejos a una concentración de 42 η M de antioxidante, utilizando la aproximación de las velocidades iniciales descrita en Materiales y Métodos.

FLAVONOIDE	Velocidad Inicial (η M / s)
Luteolina	78,5
β cd – Luteolina	5,3
Dm β cd -Luteolina	4,7
Hp β cd - Luteolina	3,4

Tabla 5: Velocidades Iniciales para Luteolina y sus complejos de inclusión con β cd, DM β cd y HP β cd a una concentración de 41,8 η M.

Posteriormente se confecciona el gráfico del Log de la concentración de antioxidante en función del Log de las velocidades iniciales para determinar el número de hidrógenos lábiles para LUT y sus complejos de inclusión de acuerdo a la ecuación 12. A modo de ejemplo, se presentan en la figura 21 el cálculo de hidrógenos para el apagamiento de DPPH por LUT.

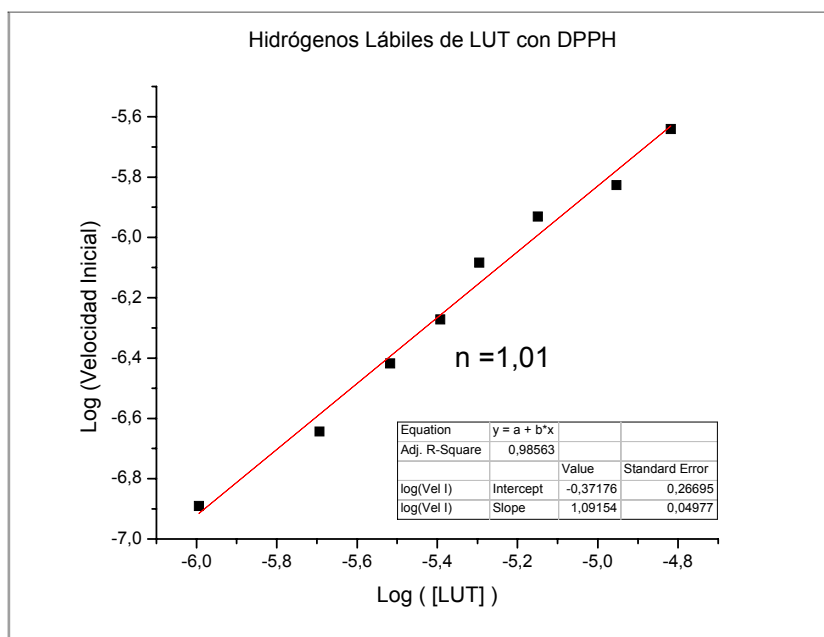


Figura 21: Gráfico de regresión entre el Log (V_i) obtenidas, en función del Log [LUT] para la determinación de los hidrógenos lábiles.

En la tabla 6 se presentan la cantidad de hidrógenos lábiles determinado para cada antioxidante.

Flavonoide	n: hidrógenos lábiles
Luteolina	1
β CD - luteolina	1
DM β cd - luteolina	1
HP β cd - luteolina	1

Tabla 6: Número de hidrógenos cedido por LUT y sus complejos de inclusión con CD para el apagamiento del radical DPPH.

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 5, se observa una notable disminución de la velocidad de atrapamiento de radicales DPPH al formar los complejos de inclusión de LUT con ciclodextrinas. Por otra parte, se observa a partir de los resultados expuestos en la tabla 6, que el número de hidrógenos disponibles no varía al formar los complejos de inclusión lo que es coherente comparado con los resultados obtenidos mediante los ensayos de ORAC.

De este modo, se puede suponer que LUT en su estado libre reacciona más rápidamente con los radicales DPPH que lo que reacciona LUT formando complejos de inclusión con ciclodextrinas, debido a que probablemente producto de la presencia de la CD, los hidrógenos del antioxidante se encuentren estéricamente menos disponibles comparado con el flavonoide libre. Sin embargo, desde el punto de vista energético de la disponibilidad de estos hidrógenos, al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas, la labilidad de los hidrógenos no cambia.

d) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE RESONANCIA DE ESPÍN ELECTRÓNICO (REE)

RADICAL DPPH

Se determinó la actividad antioxidante para LUT y sus complejos de inclusión con CDs, por apagamiento del radical estable DPPH mediante REE. Dicha técnica detectó la señal producida por DPPH, especie centrada en nitrógeno que presenta en el espectro 5 señales típicas, como se muestra en la figura 22.

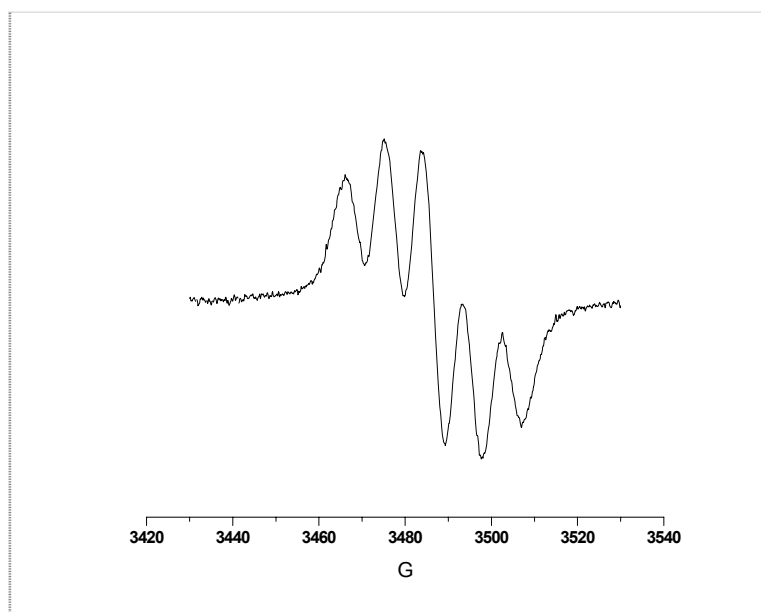


Figura 22: Espectro de REE del radical DPPH.

Se registró el espectro frente a LUT y sus 3 complejos de inclusión con CDs, luego de 1 min de iniciada la reacción a temperatura ambiente, con acumulación de 3 espectros para cada caso. Se cuantificó el porcentaje de DPPH' remanente en función del área del primer peak de la señal, dichos resultados se presentan en la tabla 7.

Flavonoide	Área peak	% DPPH' rem
------------	-----------	-------------

Blanco	$7,87 \times 10^7$	100
Luteolina	$6,85 \times 10^7$	87,1
βCD -Luteolina	$5,33 \times 10^7$	67,8
DM βCD -Luteolina	$4,86 \times 10^7$	61,8
HP βCD -Luteolina	$4,13 \times 10^7$	52,5

Tabla 7: Área del Peak y Porcentaje de DPPH' remanente para LUT y sus complejos con β -CD, DM β -CD y HP β -CD.

Para el caso de la evaluación de la actividad antioxidante de β CD-LUT, pasados varios minutos de reacción se presentó en el espectro una señal aguda e intensa a 3486 G, ver figura 23. De acuerdo a lo descrito en la literatura³⁴, la señal correspondería a la estabilización del radical fenoxilo de luteolina posterior a la extracción del hidrógeno por parte del radical DPPH, coherente a lo descrito en la ecuación 6. Lo que permite suponer que el radical LUT es más estable formando el complejo de inclusión, dado las propiedades apolares de la cavidad interna de la CD que estabiliza positivamente el radical comparado con medios polares.

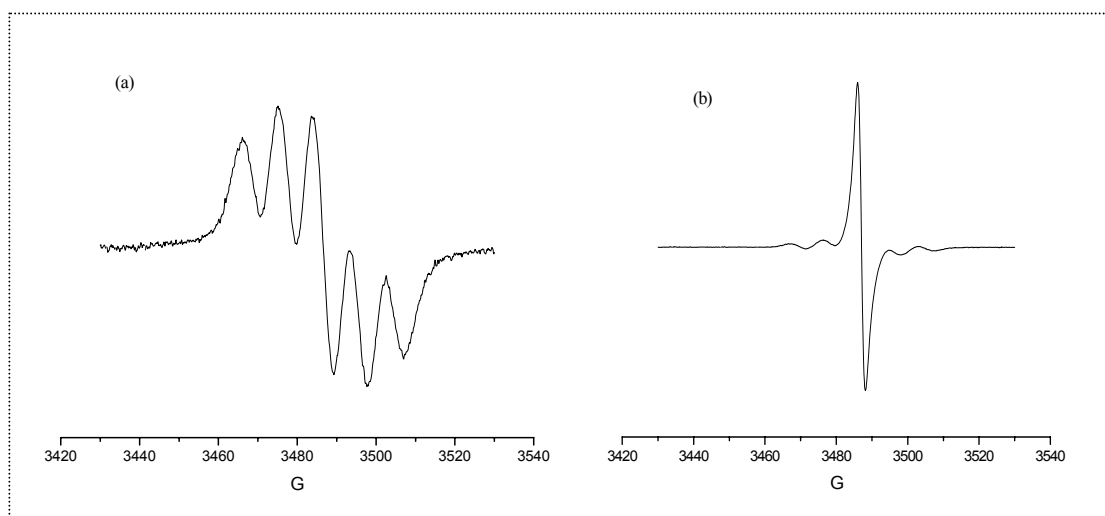


Figura 23: Espectro de REE del radical DPPH. (a) DPPH sin adición de antioxidante (blanco) (b) DPPH con $5\mu\text{M}$ de β -CD-LUT.

RADICAL GALVINOXIL

Se determinó la actividad antioxidante para LUT y sus complejos de inclusión con CDs, por apagamiento del radical estable centrado en oxígeno GVX mediante REE³⁵. Se presenta en la figura 24 el espectro típico de una gran señal producto de la deslocalización del electrón desapareado en toda la molécula.

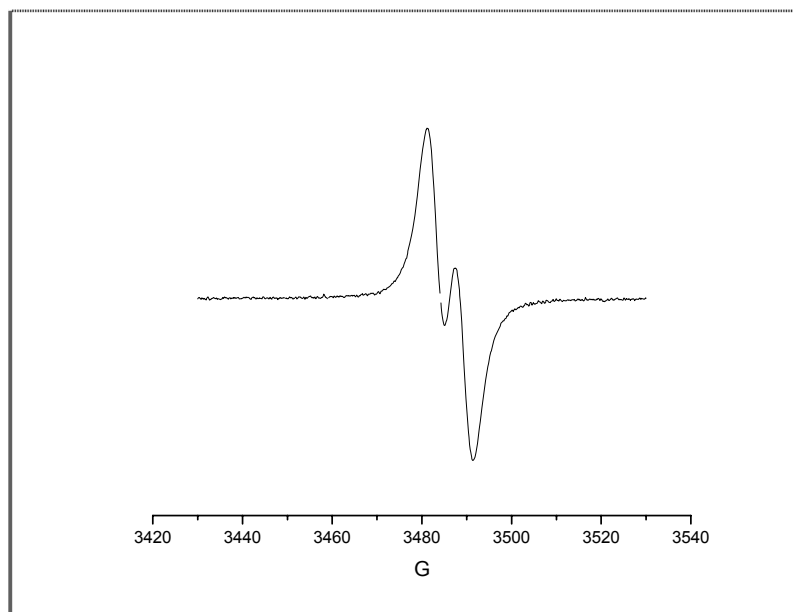


Figura 24: Espectro de REE del radical GVX.

Al igual que lo realizado para DPPH, se registró el espectro frente a LUT y sus 3 complejos de inclusión con CDs a concentración constante, luego de 1 min de iniciada la reacción, a temperatura constante con acumulaciones de 3 espectros. Se cuantificó el porcentaje de GVX' remanente en función del área del primer peak de la señal, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8.

Flavonoide	Área peak	% GVX[*] rem
Blanco	4,41 x 10 ⁷	100
Luteolina	2,59 x 10 ⁷	58,7
βCD-Luteolina	2,52 x 10 ⁷	57,1
DM βCD -Luteolina	8,18 x 10 ⁶	18,5
HP βCD -Luteolina	9,69 x 10 ⁶	21,9

Tabla 8: Área del Peak y Porcentaje de GVX^{*} remanente para LUT y sus complejos con β-CD, DMβ-CD y HPβ-CD.

Los datos presentan un comportamiento similar al obtenido con el radical estable DPPH, en que en que existe un aumento importante de la actividad antioxidante formando complejos de inclusión. Dentro de éstos, se obtuvo una mejor respuesta en cuanto a la actividad para los complejos con CDs derivatizadas.

RADICAL OH[•]

Se evaluó la reactividad de LUT y sus complejos de inclusión por medio del apagamiento del radical OH[•], generado por medio de método Fenton no catalítico descrito en Materiales y Métodos.

Se atrapó el radical OH con DMPO, para generar el spin aducto DMPO-OH[•]. Se presenta el espectro en la figura 25, las 4 señales agudas típicas producidas por dicho spin aducto.

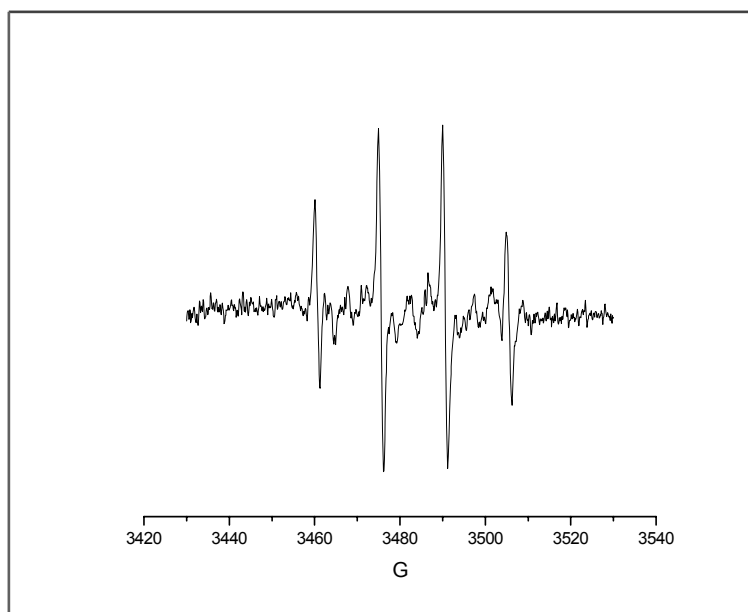


Figura 25: Espectro de REE del spin aducto DMPO-OH.

Los resultados obtenidos, de la cuantificación del área de los peak de los espectros de LUT y sus 3 complejos de inclusión, y el porcentaje de radical OH[•] remanente se presenta en la tabla 9. Las condiciones experimentales utilizadas fueron: t^o ambiente, mediciones luego de 1 min de iniciada la reacción, con acumulación de 3 espectros de REE.

Flavonoide	Área peak	% OH[•] rem
Blanco	7,35 x 10 ⁶	100
Luteolina	6,69 x 10 ⁶	91,1
βCD -Luteolina	6,50 x 10 ⁶	88,5
DM βCD -Luteolina	5,80 x 10 ⁶	78,9
HP βCD -Luteolina	4,27 x 10 ⁶	58,2

Tabla 9: Área del Peak y Porcentaje de OH[•] remanente para LUT y sus complejos con β-CD, DMβ-CD y HPβ-CD.

A partir de los datos presentados, se deduce que la actividad antioxidante aumenta formando los complejos de inclusión, presentando la mayor actividad para HPβCD-LUT.

En esta experiencia se utilizó un método no tradicional para formar radicales hidroxilo, dado que para la reacción de Fenton catalítica, se utilizan metales de cobre o hierro para la producción de OH[•], y es muy probable que el flavonoide forme un producto quelante con éstos iones metálicos, y por lo tanto, no hubiese sido posible medir –solamente- la reacción entre el radical y el flavonoide, es decir, la actividad para actuar como antioxidante.

Se presenta en la figura 26, los resultados obtenidos en porcentaje de radical remanente producido por LU y los complejos de inclusión en estudio, para cada una de las tres técnicas utilizadas en REE: atrapamiento de radical DPPH, atrapamiento de radical GVX y atrapamiento del spin aducto DMPO-OH.

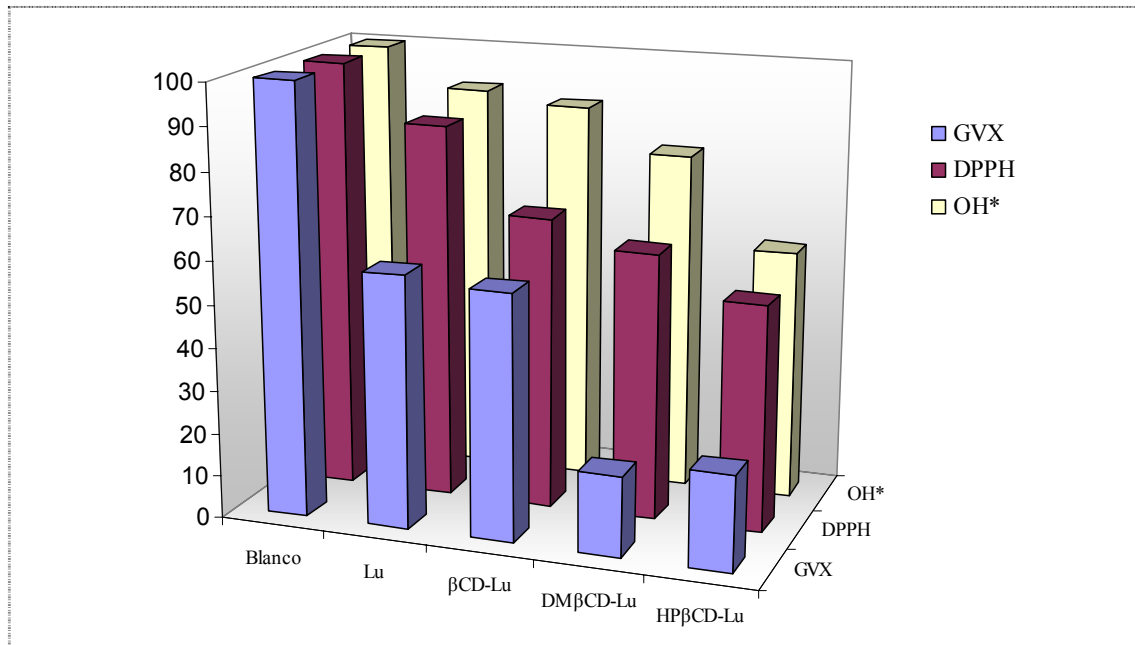


Figura 26: Porcentajes de radical remanente obtenidos mediante REE de: GVX[•], DPPH[•] y OH[•] para cada uno de los antioxidantes: blanco, LUT y sus complejos con β-CD, DMβ-CD y HPβ-CD.

Para los tres casos presentados se observa que la reactividad, en términos generales, sigue el siguiente orden creciente frente a la presencia de radicales:



Los complejos de inclusión: βCD-LUT, DMβCD-LUT y HPβCD-LUT, presentan una mejor actividad antioxidante que LUT en su estado libre. De acuerdo a estos resultados, se puede asegurar entonces, que por medio de las técnicas REE realizadas, la reactividad de Luteolina aumenta al estar formando complejos de inclusión con CDs. Esto se puede explicar, debido a la mayor estabilización posible del radical fenoxilo en la cavidad de las ciclodextrinas de carácter apolar. Esto se comprueba en una de las experiencias realizadas, en que se logró caracterizar el radical fenoxilo mediante la presente técnica espectroscópica atrapando el radical DPPH con βCD-LUT.

Además de asegurar el aumento de la reactividad formando complejos de inclusión de acuerdo a las técnicas REE utilizadas, se puede asegurar que formando complejos, LUT se hace más soluble en medios acuosos, lo que seguramente podría aumentar su biodisponibilidad.

Por otra parte, se pueden correlacionar dichos resultados con los obtenidos mediante las técnicas ORAC evaluadas:

De acuerdo a $ORAC_{FL}$ no se observa un aumento de la capacidad antioxidante al formar los complejos de inclusión con CDs, por ello se puede inferir que los hidrógenos atrapados por los radicales peroxilo en LUT libre, son los mismos hidrógenos atrapados al formar complejos. Estos resultados, son acorde a los obtenidos mediante la determinación de los hidrógenos lábiles por DPPH UV-VIS.

A partir de los resultados obtenidos mediante $ORAC_{PGR}$, se puede concluir que tanto LUT como sus complejos de inclusión, no son lo suficientemente reactivos como para competir con PGR por atrapar los radicales peroxilo, por lo tanto no es posible evaluar la reactividad de dichos compuestos a partir de esta técnica.

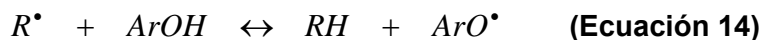
COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LUTEOLINA Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON OTROS FLAVONOIDES

Se evaluó la capacidad antioxidante por medio de la técnica ORAC_{FI}, ORAC_{PGR} y DPPH para las geninas: API, GAL, KAEM y sus complejos de inclusión con CDs. Dichos resultados, al no ser parte de los objetivos específicos del presente trabajo, se presentan en el ANEXO 1, ANEXO 2 y ANEXO 3 para API, GAL y KAEM y sus complejos de inclusión respectivamente.

A continuación, se realiza un estudio comparativo de estructura - actividad a partir de los resultados obtenidos de capacidad antioxidante para cada uno de los flavonoides y sus complejos de inclusión.

ANÁLISIS COMPARATIVO PARA FLAVONOIDES LIBRES

En términos generales, se acepta que en la reacción química presentada de acuerdo a la ecuación 14, la eficiencia de un antioxidante ArOH depende de la estabilidad del radical ArO[•]. Mientras más estable es el radical fenoxilo formado durante la reacción, el equilibrio se desplaza hacia la formación de dicho radical - hacia la derecha- más eficiente es el atrapamiento de radicales libres. Este desplazamiento está determinado por el número de enlaces de hidrógeno, conjugaciones y efectos de resonancia.



Para realizar un análisis estructura – actividad, es necesario conocer las estructuras químicas de cada uno de los flavonoides evaluados, como se muestra en la figura 27.

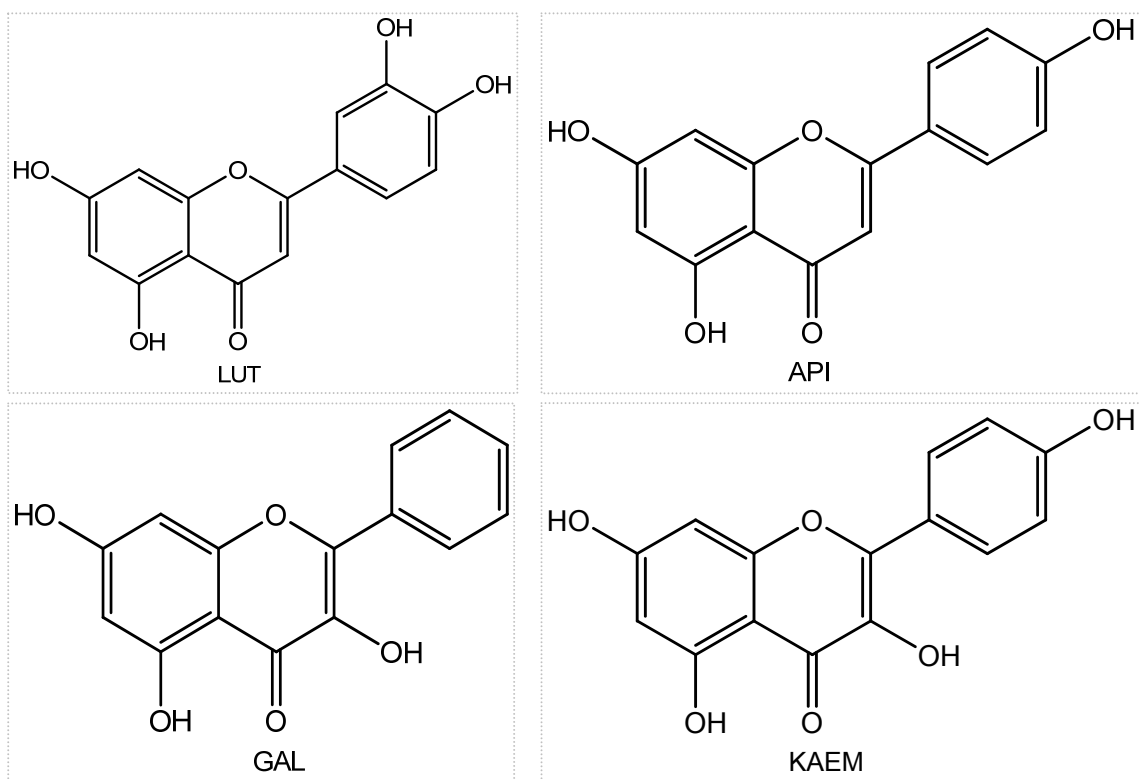


Figura 27: Estructuras moleculares de luteolina, apigenina, galangina y canferol.

A partir de las estructuras químicas presentadas, cabe notar que las diferencias de cada uno de los flavonoides estudiados radican principalmente en las sustituciones de hidroxilo en el anillo B y el anillo C, específicamente en la posición 3 del anillo C como también en 3' y 4' del anillo B. Así mismo, todos los flavonoides estudiados tienen sustituciones del grupo –OH en la posición 5 y 7 del anillo A.

Se presenta en la tabla 10 los resultados obtenidos para $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ para LUT, API, GAL y KAEM.

	T_{EQ} $ORAC_{FL}$	T_{EQ} $ORAC_{PGR}$
LUTEOLINA	8,00 ± 0,20	-
APIGENINA	8,34 ± 0,37	-
GALANGINA	4,63 ± 0,33	-
CANFEROL	9,91 ± 0,24	8,79 ± 0,24

Tabla 10: Valores de Trolox equivalentes para $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ obtenidos para LUT, API, GAL y KAEM en su estado libre.

$ORAC_{FL}$

De acuerdo a los resultados presentados, se observa que el flavonoide con mayor capacidad antioxidante corresponde a KAEM; API y LUT presentan prácticamente el mismo valor T_{EQ} , y el de menor valor en T_{EQ} corresponde a GAL.

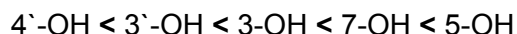
Desde las características estructurales de los flavonoides estudiados por si solos, se puede esperar que todos los flavonoides sean moderados a buenos antioxidantes, lo que se expresa de acuerdo con los valores de T_{EQ} en los ensayos de $ORAC_{FL}$ ya que todos los flavonoides son varias veces mejores que Trolox en su estado libre.

A partir de los resultados obtenidos para KAEM en $ORAC_{FL}$, se puede inferir que el grupo -OH en la posición 3` del anillo C junto con -OH en la posición 4` del anillo B son muy importantes para estabilizar el radical fenoxilo formado y atrapando eficientemente radicales peroxilo. Por otro lado, para el caso de API y LUT que no contienen el grupo -OH en la posición 3` en el anillo C disminuye la capacidad antioxidante casi en 2 unidades de T_{EQ} comparado con KAEM, así mismo se puede suponer que la estructura orto - dihidroxi en el anillo B en LUT no esta confiriendo mayor estabilidad del radical formado comparado con la estructura de una sola sustitución en el anillo B como es el caso de API, ya que no presenta mayor capacidad antioxidante atrapando radicales peroxilo de acuerdo a la metodología $ORAC_{FL}$. Para el caso de GAL, que presenta una baja capacidad antioxidante

comparada con los otros flavonoides estudiados, se puede suponer que la sustitución 3` en el anillo C no confiere - por sí solo - una alta estabilidad del radical formado, es necesario que existan también sustituciones de hidroxilos en el anillo B.

El primer mecanismo de atrapamiento de radicales libres corresponde a la transferencia de átomos de hidrógeno³⁶ (por ruptura directa del enlace O-H), para formar el radical fenoxilo. Dicho proceso, está gobernado - entre otros factores - por la entalpía de disociación de enlace (BDE), las que frecuentemente se obtienen a partir de cálculos teóricos. Dichos estudios se realizan comúnmente para elucidar la capacidad de transferencia de átomos de hidrógenos de grupos hidroxilo de antioxidantes fenólicos.

Trouillas et al³⁷, estimaron las BDE para quercetina, estructura molecular presentada en la figura 28, que contiene grupos 5-OH y 7-OH en el anillo A (sustituciones que están presentes en los 4 flavonoides estudiados); 3-OH en el anillo C (al igual que GAL y KAEM); 3`-OH y 4`-OH en el anillo B (di-OH orto al igual que LUT). La QUE se considerado como un antioxidante de origen natural presente en variados alimentos y extractos de plantas.¹⁶ En dicho estudio, determinaron la secuencia energética creciente favorable para la transferencia de átomos de hidrógeno de los grupos -OH de quercetina correspondiente a:



Considerando los buenos resultados para las evaluaciones de capacidad antioxidante realizados en estudios previos para quercetina realizados por distintas metodologías,^{10, 32} junto con los resultados obtenidos de ORAC_{Fl} con los flavonoides utilizados en nuestro estudio, se puede suponer - en términos de estructura- que la presencia del grupo 3-OH junto con sustituciones de hidroxilo en el anillo B incrementan notablemente la capacidad antioxidante, debido a que son los más favorecidos energéticamente para reaccionar atrapando radicales libres, y más aún si existe el grupo catecol en dicho anillo, en conjunto con el doble enlace 2,3 conjugado con el 4-oxo en el anillo C; así mismo, los grupos hidroxilo en las

posiciones 5 y 7 del anillo A, son menos importantes debido a que se encuentran menos favorecidos energéticamente para la transferencia de protones requerida para atrapar radicales libres.

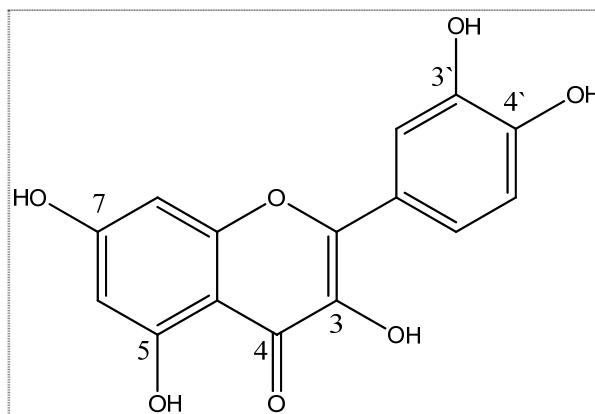


Figura 28: Estructura molecular de quercetina.

ORAC_{PGR}

A partir de los resultados obtenidos en ORAC_{PGR} presentados en la tabla 10, se puede inferir que el único flavonoide que protege a PGR corresponde a KAEM, esto se debe probablemente a que, dicho flavonoide proporciona hidrógenos presentes en los grupos hidroxilo, lo suficientemente disponibles para reaccionar con los radicales peroxilo en el medio de reacción, lo que se expresa en la competencia relativa con PGR. En comparación con los otros flavonoides, se puede suponer que la sustitución 3 -OH del anillo C, junto con la posición 4`-OH del anillo B, le confieren a KAEM la reactividad suficiente como para competir con PGR, sustituciones que en su conjunto no están presentes en ninguno de los otros flavonoides evaluados.

Por otra parte, se puede deducir que los valores T_{EQ} en ORAC_{FL} y en ORAC_{PGR} no tienen relación entre si, sólo dan una estimación - en función de Trolox - de la capacidad de actuar / reaccionar para cada antioxidante, es decir, los valores de ORAC dependen de la metodología empleada.

ANÁLISIS COMPARATIVO PARA FLAVONOIDES FORMANDO COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON β -CICLODEXTRINA

En la tabla 11, se presentan los resultados obtenidos en las metodologías de $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$, empleadas para los flavonoides: LUT, API, GAL y KAEM formando complejos de inclusión con β -CD.

	T_{EQ} $ORAC_{FL}$	T_{EQ} $ORAC_{PGR}$
β-CD -LUTEOLINA	8,34 \pm 0,15	-
β-CD -APIGENINA	14,56 \pm 0,50	-
β-CD -GALANGINA	1,45 \pm 0,15	-
β-CD -CANFEROL	11,95 \pm 0,25	13,64 \pm 0,64

Tabla 11: Valores de Trolox equivalentes para $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ obtenidos para los complejos de inclusión de LUT, API, GAL y KAEM con β -CD.

$ORAC_{FL}$

Los resultados presentados en la tabla 11 para la metodología $ORAC_{FL}$, muestran que para el caso de los complejos de inclusión β CD-LUT, no se observan cambios sustanciales en los valores de capacidad atrapadora de sustancias reactivas a oxígeno comparadas con el flavonoides libre, la explicación se presenta en la sección anterior: Evaluación de la actividad antioxidante de Luteolina y sus complejos de inclusión, Pág.: 30 – 38.

Para el caso del complejo de inclusión β CD – API, se observa un notable aumento de la capacidad antioxidante en relación a los resultados de API en su estado libre, resultados de $ORAC_{FL}$ exhibidos en la tabla10, a partir de dichos resultados se puede inferir que la formación del complejo de inclusión, deja más lábiles los grupos –OH al medio de reacción para que puedan reaccionar con los radicales peroxilo

presentes. Este aumento de la capacidad antioxidante, se expresa en las cinéticas de decaimiento de la fluorescencia, ya que al tener una mayor capacidad antioxidante, el decaimiento es más lento, dado que los radicales peroxilo extraen todos los hidrógenos disponibles del antioxidante para luego oxidar la fluoresceína, tal como se presenta a modo de ejemplo en la figura 29, en que se comparan decaimientos de fluorescencia para β CD-apigenina y β CD-luteolina a concentraciones similares, incluso un poco mayores para el complejo de LUT. La comparación de las diferencias se expresa en términos cuantitativos, en el área bajo la curva de cada decaimiento. Por otro lado, se puede inferir que la β -CD confiere una alta estabilización al radical fenoxilo en la formación del complejo de inclusión con API, posiblemente por el carácter apolar de la cavidad de la CD que favorece la planaridad, los efectos de resonancia y conjugaciones del nuevo radical formado.

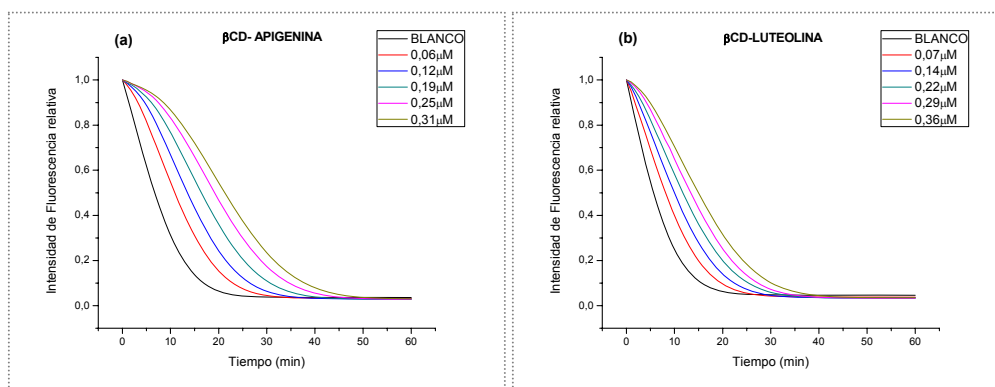


Figura 29: Perfiles cinéticos de consumo de FL inducidos por AAPH en presencia de (a) β -CD-API y (b) β -CD-LUT a diferentes concentraciones.

Para explicar los resultados obtenidos, se comparan los resultados obtenidos para luteolina y apigenina, que poseen grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A con los resultados presentados en la tabla 12 por Leopoldini et al³⁸. En dicha publicación, se caracterizan las especies radicalarias producidas por la extracción de un átomo de hidrógeno en flavonoides con sustituciones 3'-OH, como es el caso de LUT, los resultados revelan que los enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo en el anillo B están mas cerca del mínimo absoluto de energía, lo que influencia de manera importante la estabilidad del radical. En los flavonoides, el anillo B es el más

importante sitio para la transferencia de átomos de hidrógeno. Las especies con sustituciones en las posiciones 5-OH y 7-OH presentes en API y LUT, para el caso de LUT presentan energías de enlace de 31,45 y 12,86 Kcal/mol. Estos radicales se caracterizan por una escasa deslocalización y por lo tanto, una menor estabilización del radical fenoxilo. Además, la abstracción del átomo de hidrógeno del hidroxilo en la posición 5, implica la ruptura del puente de hidrógeno que forma con el grupo ceto de la posición 4 del anillo C.

Apigenina	O-H BDE Kcal/mol	Luteolina	O-H BDE Kcal/mol
-	-	3`-OH	2,28
4`-OH	0,00	4`-OH	0,00
5-OH	23,84	5-OH	31,45
7-OH	5,19	7-OH	12,86

Tabla 12: Entalpías de disociación de enlace relativas para las especies radicalarias de apigenina y luteolina

A partir de estas mismas deducciones, existe otro antecedente para explicar los altos valores de T_{EQ} en los resultados de β CD-API en $ORAC_{FL}$, en que se puede suponer, que la inclusión de β CD-apigenina se efectúa orientando el anillo A hacia la cavidad de la CD, dejando disponible al medio el anillo B el grupo 4`-OH para reaccionar con los radicales peroxilo.

Para el caso de la respuesta obtenida en $ORAC_{FL}$ para β CD-GAL, se observa una importante disminución de la capacidad antioxidante. Dicha respuesta, no sigue las tendencias anteriores en que se observa un aumento o permanencia de la capacidad antioxidante comparada con la capacidad presentada para los flavonoides libres, es decir, posiblemente el proceso de inclusión deja menos asequibles los hidrógenos que pueden atrapar los radicales libres en el medio de reacción, como son los hidrógenos de 3-OH, 5-OH y 7-OH.

En la tabla 11 se presentaron además los resultados de $ORAC_{FL}$ para β CD-KAEM, en que se observa un notable aumento de la capacidad antioxidante en comparación con el flavonoide libre, esto posiblemente se debe a la alta estabilización del radical fenoxilo formado luego de las extracciones de los hidrógenos por parte de los radicales peroxilo. Cabe notar, que el resultado de T_{EQ} en β CD-KAEM, es menor que β CD-API, a pesar que en el estudio de $ORAC_{FL}$ a los flavonoides libres, en el canferol se observa una notable mejoría en la capacidad antioxidante comparada con apigenina. Esto se puede explicar a partir de la relativamente alta solubilidad de canferol en medios polares comparado con apigenina, de este modo se forman menores interacciones con la cavidad de la CD en el KAEM que con API.

$ORAC_{PGR}$

En los resultados presentados, se observa que el único complejo de inclusión que presenta una respuesta corresponde a β CD-KAEM. En la figura 30, a modo de ejemplo, se presentan los perfiles cinéticos de decaimiento de la absorbancia de PGR inducidos por los radicales peroxilo en presencia de β CD-KAEM, dichos resultados son absolutamente coherentes, dado que KAEM el único flavonoide que - en estado libre - tiene respuesta positiva para $ORAC_{PGR}$ y, a su vez, no presenta una disminución de su capacidad antioxidante para $ORAC_{FL}$. A partir de los resultados presentados, se desprende que existe un aumento cercano al doble en la reactividad para KAEM formando complejos de inclusión con β CD, comparado con la reactividad obtenida para KAEM libre. Esto implica que el complejo de inclusión β CD-KAEM compite aún más eficientemente con PGR por atrapar radicales libres que el flavonoide en su estado libre.

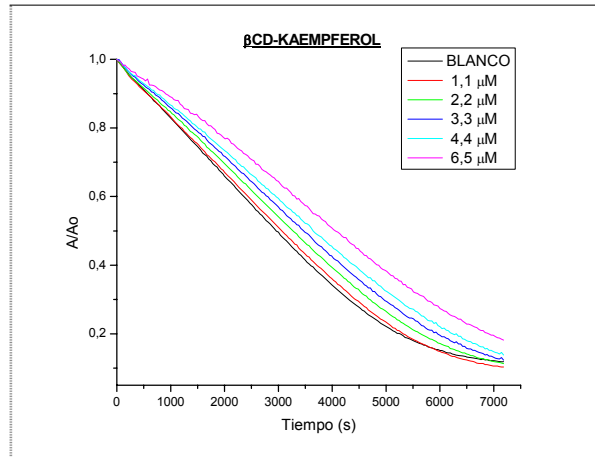


Figura 30: Perfiles cinéticos de consumo de PGR inducidos por AAPH en presencia de (a) β -CD-KAEM a diferentes concentraciones.

Reactividad que no se ve mejorada al formar complejos de inclusión con β CD para los otros flavonoides evaluados, entre ellos, llama la atención la respuesta de $ORAC_{PGR}$ para el complejo de β CD-API, ya que a pesar de presentar una altísima capacidad antioxidante no es lo suficientemente reactiva formando complejos con β CD, ya que no protegen al PGR en las condiciones experimentales presentadas.

ANÁLISIS COMPARATIVO PARA FLAVONOIDES FORMANDO COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON DM β -CICLODEXTRINA

Del mismo modo que en el estudio anterior, se presenta en la tabla 13 los resultados obtenidos en las metodologías de ORAC_{FL} y ORAC_{PGR}, empleadas para los flavonoides: LUT, API, GAL y KAEM formando complejos de inclusión con DM β -CD.

	T _{EQ} ORAC _{FL}	T _{EQ} ORAC _{PGR}
DMβCD -LUTEOLINA	9,14 \pm 0,36	-
DMβCD -APIGENINA	13,81 \pm 0,51	11,36 \pm 0,14
DMβCD -GALANGINA	3,34 \pm 0,25	-
DMβCD -CANFEROL	11,53 \pm 0,35	12,04 \pm 0,91

Tabla 13: Valores de Trolox equivalentes para ORAC_{FL} y ORAC_{PGR} obtenidos para los complejos de inclusión de LUT, API, GAL y KAEM con DM β -CD.

En términos generales, cabe notar que en este caso se realizan mediciones de capacidad antioxidante para complejos de inclusión con dimetil- β ciclodextrina, que en comparación con la ciclodextrina nativa, presenta sustituciones metílicas adicionales que proporcionan una mayor superficie y posibilidades de interacción con el flavonoide.

ORAC_{FL}

A partir de los resultados presentados para DM β CD-LUT, se observa un aumento sutil de la capacidad antioxidante comparado con LUT en su estado libre, como también formando complejos con β CD. De este modo, podemos suponer que la inclusión en este caso se efectuaría, dejando disponibles al medio el grupo catecol del anillo B para reaccionar con los radicales peroxilo formando radicales fenoxilo más estables, además que dicho radical formado se estabiliza mejor en la cavidad

de DM- β CD, comparado con la ciclodextrina nativa. Se puede suponer esta inclusión, dado que corresponden a los grupos hidroxilos del anillo B, los más favorecidos energéticamente para la transferencia de átomos de hidrógeno.

En el caso de DM β CD-API no se observan cambios en la capacidad antioxidante respecto del complejo de inclusión con β CD-API ya que tomando en cuenta la desviación estándar, el cambio no es significativo, pero sigue existiendo aún una diferencia notable respecto del flavonoide libre. Por lo tanto, se puede suponer que la conformación del complejo de inclusión es muy similar al propuesto con β CD-API, dejando preferentemente disponible al medio el grupo hidroxilo del anillo B, estabilizando fuertemente el radical antioxidante.

Por otro lado, para DM β CD-GAL se observa un aumento de la capacidad antioxidante comparada con β CD-GAL, sin embargo una notable disminución - para ambos casos - en relación a GAL libre. Esto se puede deber a que en términos generales, la actividad antioxidante de los flavonoides se atribuye en gran medida a la transferencia de átomos de hidrógenos de -OH en el anillo B³⁷, sustituciones de grupos hidroxilo que no existen en GAL, por ello es absolutamente esperable sus resultados de capacidad antioxidante en su estado libre, capacidad que tampoco se ve favorecida al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas. Sin embargo, cabe notar que el leve aumento del complejo DM β CD se pueda deber a la mejor estabilización del radical formado comparado con β CD, producto de las mayores interacciones de carácter hidrófobas de la cavidad con GAL.

Realizando el análisis de los resultados con el complejo de inclusión DM β CD-canferol, no se presentan diferencias significativas respecto del complejo de inclusión con β CD, pero sigue existiendo la diferencia con el KAEM en estado libre, probablemente esto se deba a la alta estabilización del radical antioxidante formado.

ORAC_{PGR}

De acuerdo a lo esperado, DM β CD-KAEM presenta valores altos de T_{EQ} casi al mismo nivel que con β CD y el notable cambio en la reactividad comparado con KAEM libre. Por lo tanto, la formación de complejos de inclusión con DM β CD, al igual que con la ciclodextrinas nativa, permite una alta competencia con PGR por atrapar los radicales libres en el medio de reacción.

Una respuesta muy positiva se presenta en el caso de DM β CD-API, en que probablemente, el aumento de la superficie de interacción posibilite una mejor estabilización del radical formado, permitiendo además que DM β CD-API mejore sustancialmente su reactividad comparado con el flavonoide libre y con el complejo formado con la ciclodextrinas nativa, debido a que esta conformación le permite efectivamente, competir con PGR por atrapar radicales peroxilo.

ANÁLISIS COMPARATIVO PARA FLAVONOIDES FORMANDO COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON HP β -CICLODEXTRINA

Del mismo modo que en el estudio anterior, se presenta en la tabla 14 los resultados obtenidos en las metodologías de ORAC_{FL} y ORAC_{PGR}, empleadas para los flavonoides: LUT, API, GAL y KAEM formando complejos de inclusión con HP β -CD, que comparada con la ciclodextrina nativa, presenta sustituciones adicionales, proporcionando mayor superficie y posibilidades de interacción.

	T_{EQ} ORAC_{FL}	T_{EQ} ORAC_{PGR}
HPβCD -LUTEOLINA	8,99 \pm 0,37	-
HPβCD -APIGENINA	14,99 \pm 0,26	8,99 \pm 0,52
HPβCD -GALANGINA	4,47 \pm 0,15	-
HPβCD -CANFEROL	12,85 \pm 0,03	9,71 \pm 0,09

Tabla 14: Valores de Trolox equivalentes para ORAC_{FL} y ORAC_{PGR} obtenidos para los complejos de inclusión de LUT, API, GAL y KAEM con HP β -CD.

ORAC_{FL}

De acuerdo a los datos presentados, en el complejo de inclusión formado: HP β CD-LUT no se observan cambios sustanciales con DM β CD-LUT, ni tampoco con β CD-LUT en comparación con el flavonoide libre.

Un sutil aumento de la capacidad antioxidante se observa con HP β CD-API en comparación con DM β CD-API, sin embargo, comparada con API libre es donde se presenta un notable aumento casi en el doble de la capacidad, producto de la alta estabilidad del radical fenoxilo formado producto de la reacción producida con los radicales peroxilo.

Por otra parte, en la respuesta para el complejo de inclusión de HP β CD-GAL se observa un aumento de la capacidad antioxidante en comparación a las otras CDs, sin embargo, no hay diferencias significativas comparadas con GAL libre. Esto se puede deber, probablemente a la geometría de inclusión analizada por C. Jullian ³⁹, donde describe que el anillo B de GAL se encuentra incluido por el lado de los hidroxilos primarios de HP β CD, es decir por el lado angosto de la CD dejando disponible al medio a la cromona, esto puede permitir dejar más expuestos a la acción de los radicales el anillo C con el grupo 3-OH, como también los 5-OH y 7-OH del anillo A, de este modo el radical formado producto de la reacción de apagamiento de radicales, no se encuentra más favorecido al formar un complejo de inclusión que en su estado libre, dado que ambos valores de capacidad antioxidante - como decíamos- son muy parecidos.

En el caso de HP β CD-KAEM se observa un aumento en la capacidad antioxidante formando el complejo de inclusión, comparado con las otras CD como también con el flavonoide libre.

ORAC_{PGR}

Tal como se esperaba, los únicos complejos de inclusión que presentan una respuesta frente a las evaluaciones de reactividad son HP β CD-KAEM y HP β CD-API, debido a que presentan para valores muy altos de T_{EQ} para ORAC_{FL}, sin embargo, para ambos casos se observa una disminución de la reactividad frente a los radicales peroxilo comparado con sus respectivos complejos de inclusión con DM β CD, esto se puede deber a que HP β CD proporciona menos estabilidad al radical antioxidante formado, que lo que puede hacerlo su análoga CD derivatizada (DM β CD).

ANÁLISIS COMPARATIVO PARA FLAVONOIDES LIBRES Y FORMANDO COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS ATRAPANDO RADICAL DPPH POR UV-VIS

Debido a que no es posible comparar los resultados obtenidos por apagamiento del radical DPPH por UV-VIS con la aproximación de velocidades iniciales entre flavonoides libres, ni tampoco entre complejos de distintos flavonoides, debido a que no se utilizaron concentraciones iguales para cada uno de los ensayos, se realiza un análisis comparativo – solamente - entre los flavonoides y sus respectivos complejos de inclusión a partir de los resultados presentados en los Anexos 1,2 y 3.

APIGENINA Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Se determinaron las velocidades iniciales para el apagamiento del radical estable DPPH mediante UV-VIS. En la figura 31 se presenta un gráfico de barras con las velocidades iniciales de apagamiento por apigenina y sus complejos de inclusión con las CDs analizadas. En dicho gráfico, se observa que al formar complejos de inclusión, la velocidad de apagamiento de radicales DPPH aumenta hasta 4 veces comparado con apigenina libre. Dichos resultados son absolutamente coherentes de acuerdo a los resultados obtenidos mediante las metodologías $ORAC_{FL}$ y $ORAC_{PGR}$ anteriormente realizadas. Mediante la metodología ORAC medida por fluorescencia se observa que, formando complejos de inclusión con ciclodextrinas, la capacidad antioxidante de atrapamiento de radicales peroxilo aumenta casi al doble comparado con el flavonoide libre. Mediante ORAC por UV-VIS, se observa una alta reactividad solamente para los complejos de inclusión con ciclodextrinas derivatizadas.

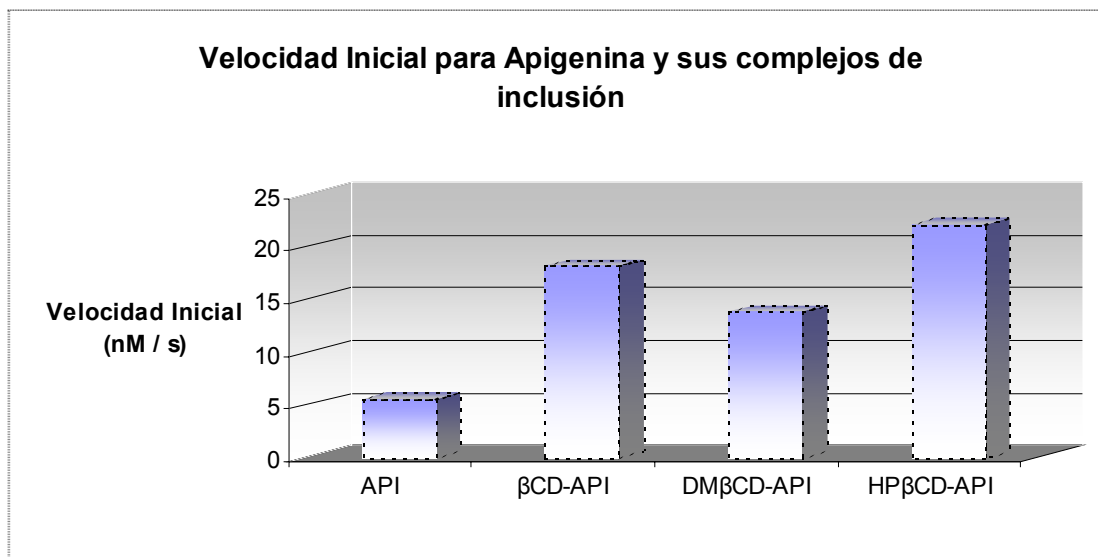


Figura 31: Velocidades iniciales obtenidas por apagamiento del radical DPPH por API y sus complejos de inclusión con β -CD, DM β -CD y HP β -CD a una concentración de 115 μ M, mediante UV-VIS.

Por otra parte, se determinaron el número de hidrógenos lábiles para cada uno de los compuestos de API analizados, que se presentan en la tabla 15 siguiente.

DPPH	n: hidrógenos lábiles
Apigenina	1
β CD - apigenina	1
DM β CD - apigenina	1
HP β CD - apigenina	1

Tabla 15: Número de hidrógenos cedido por LUT y sus complejos de inclusión con CD para el apagamiento del radical DPPH.

A partir de los valores presentados en la tabla 15, se desprende que el número de hidrógenos extraídos por el radical DPPH no varía con la formación de los complejos de inclusión.

GALANGINA Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Se determinaron las velocidades iniciales para el apagamiento del radical estable DPPH. En la figura 32 se presentan las velocidades iniciales de apagamiento por galangina y sus complejos de inclusión con las CDs analizadas. Dicho gráfico, permite observar que existe un aumento de la velocidad inicial de GAL al formar complejos de inclusión con las tres ciclodextrinas analizadas.

Por otra parte, el número de hidrógenos no varía al formar complejos de inclusión con CD, ya que para todos los casos el número de hidrógenos lábiles es 1 de acuerdo a esta metodología.

Los resultados presentados, indican que al formar complejos de inclusión el hidrógeno lábil es extraído más rápidamente que GAL libre, por lo tanto la disminución del color morado en la mezcla de reacción debido al apagamiento del radical DPPH, ocurre con mayor velocidad con los complejos.

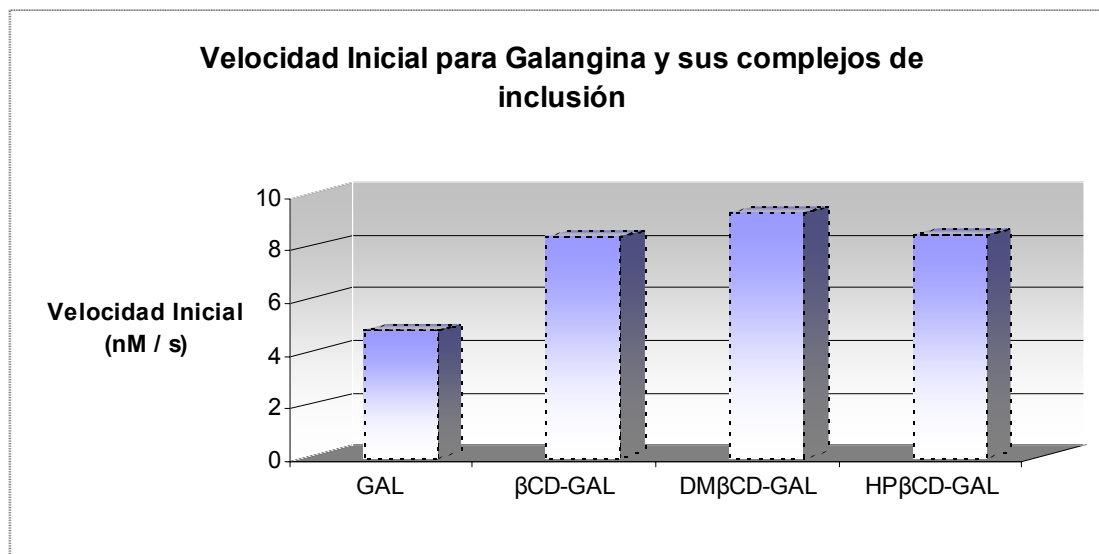


Figura 32: Velocidades iniciales obtenidas por apagamiento del radical DPPH por GAL y sus complejos de inclusión con β-CD, DMβ-CD y HPβ-CD a una concentración de 58,4μM, mediante UV-VIS.

CANFEROL Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

Se determinaron las velocidades iniciales para el apagamiento del radical estable DPPH. En la figura 33, se presentan las velocidades iniciales de apagamiento por canferol y sus complejos de inclusión con las CDs analizadas. A partir de dicho gráfico, se observa que en el caso del complejo DM β CD, es el que presenta un aumento mayor de la actividad antioxidante, de acuerdo a los resultados observados en las metodologías ORAC cabe notar, que dicho complejo presenta muy buena capacidad antioxidante como también una notable reactividad, esto comparado con KAEM en su estado libre como con los otros flavonoides analizados. No existe mayor diferencia a los valores de velocidades iniciales entre KAEM y sus complejos de inclusión con la ciclodextrina nativa y con la ciclodextrina derivatizadas con 2-hidroxipropil.

De acuerdo a los resultados obtenidos del cálculo de hidrógenos lábiles, no se presentan cambios en número (para todos los casos es 1), al realizar el análisis con los complejos de inclusión con CDs.

Por lo tanto, se puede deducir que si bien existe un aumento de la capacidad antioxidante y un aumento de la reactividad de KAEM al formar complejos de inclusión con CDs, no existe un aumento de la velocidad inicial de acuerdo a las condiciones experimentales realizadas. Al igual que no existe un aumento del número de hidrógenos disponibles para apagar el radical DPPH.

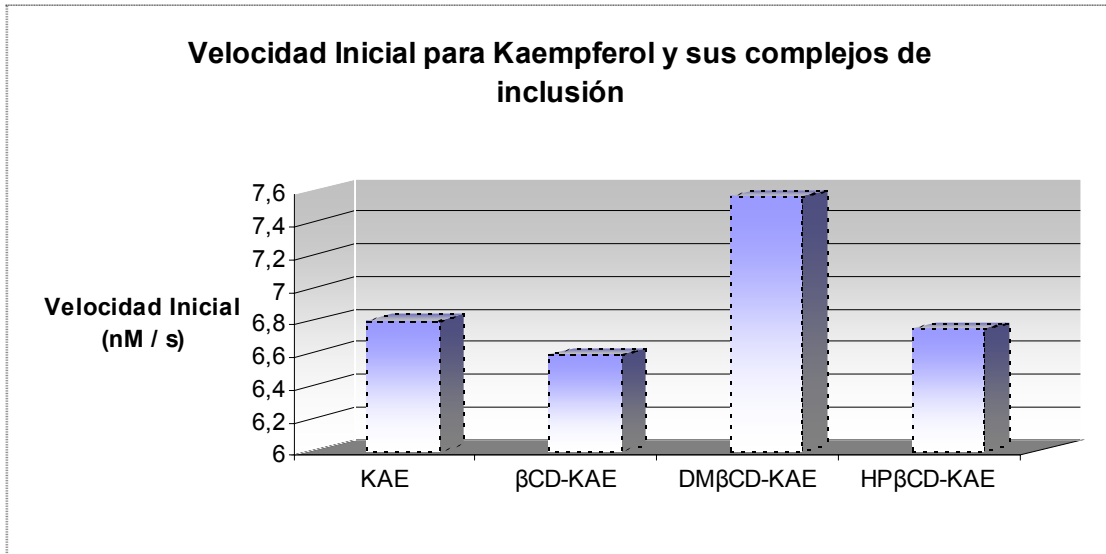


Figura 33: Velocidades iniciales obtenidas por apagamiento del radical DPPH por KAEM y sus complejos de inclusión con β -CD, DM β -CD y HP β -CD a una concentración de 39,8 η M, mediante UV-VIS.

CONCLUSIONES

- La formación de los complejos de inclusión de LUT con β -CD, DM β -CD y HP β -CD, presentan para todos los casos una estequiometría 1:1, de acuerdo al método de variación continua. Por otra parte, las constantes de asociación determinadas mediante Benesi-Hildebrand por fluorescencia, presentan comparado con la ciclodextrina nativa, valores de 4 y 6 veces aproximadamente para los complejos con ciclodextrinas derivatizadas, DM β -CD y HP β -CD, respectivamente.
- Los estudios de actividad antioxidante realizados para LUT y sus complejos de inclusión, presentan de acuerdo a las metodologías ORAC, que la capacidad antioxidante se mantiene al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas. A partir de los resultados de atrapamiento del radical DPPH, se observa que la velocidad de atrapamiento disminuye al formar complejos de inclusión, sin embargo la labilidad de los hidrógenos se mantiene. Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos por REE, se observa que la actividad de los complejos de inclusión aumenta formando complejos de inclusión, presentando una mayor diferencia respecto de LUT libre para el caso del complejo de inclusión con HP β -CD.
- Los estudios de reactividad realizados para flavonoides libres por medio de las técnicas ORAC, indican que el flavonoide que presenta una mayor capacidad antioxidante corresponde a KAEM, luego a un mismo nivel se encuentra LUT y API, y el de menor capacidad antioxidante corresponde a GAL. Dichos resultados, se relacionaron con las posiciones de los grupos hidroxilo en cada una de las estructuras químicas analizadas, que

permitieron deducir, a partir de sus diferencias, que -OH en la posición 3 del anillo C y en la posición 3' y/o 4' en el anillo B, favorecen la capacidad antioxidante y la reactividad. Por otra parte, las ciclodextrinas derivatizadas confieren mayor estabilidad al radical antioxidante formado.

- Los resultados de reactividad realizados por medio de las técnicas ORAC para los complejos de inclusión con β -CD, DM β -CD y HP β -CD, no presentan una tendencia definida. Para el caso de LUT, la capacidad antioxidante formando complejos se mantiene o aumenta levemente, para API se observa que la capacidad antioxidante aumenta incluso al doble, para el caso de GAL se observa que disminuye notablemente y finalmente, para el caso de KAEM presenta un aumento importante. Dichos resultados, se podrían explicar desde conocimientos específicos de la geometría de inclusión característica a cada complejo de inclusión.
- Las metodologías ORAC utilizadas para la determinación de la capacidad antioxidante, permitieron comparar resultados entre los flavonoides libres y sus complejos de inclusión. Los resultados fueron concordantes entre sí, además presentaron una alta reproducibilidad y sensibilidad lo que proporciona confiabilidad en los resultados.
- A pesar de que no se observa un aumento importante en los resultados obtenidos de capacidad antioxidante, mediante la técnica de ORAC_{FL} para los complejos de inclusión de LUT con β -CD, DM β -CD y HP β -CD comparado con el flavonoide libre, cabe notar que no hay disminución. Además los complejos de inclusión presentan, de acuerdo a los valores de las constantes de asociación obtenidas, un notable desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo de inclusión, por tanto, los complejos formados presentarían una mayor solubilidad del complejo en

medios acuosos, lo que permitiría suponer una mejora en la biodisponibilidad de LUT. Esto revelaría una idea interesante para el desarrollo de posibles suplementos alimenticios con mejores propiedades antioxidantes.

➤ Las metodologías utilizadas como son $ORAC_{FL}$, $ORAC_{PGR}$, REE y atrapamiento de radical DPPH, permitieron en su conjunto evaluar y comparar para cada uno de los compuestos analizados, ya sea su capacidad antioxidante, reactividad y actividad. Los resultados fueron, en términos generales, coherentes entre si de acuerdo a las condiciones experimentales realizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. MACKENBACH J. P. The Mediterranean diet story illustrates that “why” questions are as important as “how” questions in disease explanation. Journal of Clinical Epidemiology. 60: 105-109 (2007).
2. MANCINI M. and STAMLER J. Diet for preventing cardiovascular disease: Light from Ancel Keys, Distinguished Centenarian Scientist. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 14: 52-57 (2004).
3. ROOT M. and ANDERSON J. J. B. Dietary effects on nontraditional risk factors for heart disease. Nutrition Research. 24: 827-838 (2004).
4. DEL RIO D., COSTA L.G., LEAN M. E. J., CROZIER A. Polyphenols and Elath: What compounds are involved?. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. 1-6 (2009).
5. OU B., HUANG D., HAMPSCHE-WOODILL M., FLANAGAN J. A., and DEEMER E.. Analisis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay: A comparative study. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 3122-3128 (2002).
6. ROUANET J.- M., DECORDÉ K., DEL RIO D., AUGER C., BORGES G., CRISTOL J.- P., LEAN M. E.J., CROZIER A. Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. Food Chemistry. 118: 266-271 (2010).
7. LE MARCHAND L.. Cancer preventive effects of flavonoids – a review. Biomedicine & Pharmacotherapy. 56: 296-301 (2002).
8. LÓPEZ-ALARCÓN C., ASPEÉ A., LISSI E. Antioxidant reactivity evaluated by competitive kinetics: Influence of target molecule concentration. Food Chemistry. 104:1430-1435 (2007).
9. IACOPINI P., BALDI M., STORCHI P., SEBASTIANI L.. Catechin, epicatechin, quercetina, rutin and resveratrol in red grape: Content, in Vitro antioxidante activity and interactions. Journal of Food Composition and Analisis. 21: 589-598 (2008).
10. TABART J., KEVERS C., PINCAMAIL J., DEFRAIGNE J.- O., DOMMES J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various test. Food Chemistry.

11. MULLEN W., ARCHEVEQUE M. – A., EDWARDS C. A., MATSUMOTO H. AND CROZIER A. Bioavailability and Metabolism of Orange Juice Flavanones in humans: Impact of a full – fat Yogurt. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 11157-11164 (2008).
12. THAVASI V., PENG LEONG L. and BETTENS R. P. A. Investigation of the influence of hydroxyl groups on the radical scavenging ability of polyphenols. Journal of Physical Chemistry A. 110: 4918-4923 (2006).
13. BORS W., HELLER W., MICHAEL C. and SARAN M. In Methods in Enzymology; Packer L., Glazer, A.N. Eds., Academic Press: San Diego, CA, 1990; Vol 186, pp.343-355.
14. AMIC D., DAVIDOVIC-AMIC D., BESLO D., RASTIJA V., LUCIC B. and TRINAJSTIC N.. SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of flavonoids. Current Medicinal Chemistry. 14: 827-845 (2007).
15. BORS W., BUTKOVIC V. and KLASINC L. Kinetics Study of flavonoids reaction with stable radicals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 2816-2820 (2004).
16. MOHAMED S. and MIEAN K. H. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin and Apigenin). Content of Edible tropical plant. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 3106-3112 (2001).
17. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, asn naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutrition Research 24: 852-874 (2004).
18. YAN W. , PENG B. and ZI J. Measurement and correlation of solubilities of Luteolin in organic solvents at different temperatures. Journal of Chemical and Engieneering Data. 51 (6): 2038-2040 (2006).
19. SUDHANDIRAN G. and ASHOKKUMAR P. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. Biomedicine & Pharmacotherapy. 62: 590-597 (2008).
20. BURDA S. and OLESZEK W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry.49: 2774-2779 (2001).
21. WEI Y.-L., DING L.-H., DONG C., NIU W.-P., SHUANG S.- M. Study on inclusion complex of cyclodextrin with methyl xanthine derivatives by fluorimetry. Spectrochimica acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 59: 2697-2703 (2003).

22. JULLIAN C., MIRANDA S., ZAPATA - TORRES G., MENDIZABAL F. AND OLEA - AZAR C. Studies of inclusion complexes of natural and modified ciclodextrina with (+) catechin by NMR and molecular modeling. Biorganic & Medicinal Chemistry. 15: 3217-3224 (2007).
23. LUCAS- ABELLÁS C., FORTEA M. I., GABALDÓN J. A., NÚÑEZ-DELICADO E. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assay. Food Chemistry. 111: 262-267 (2008).
24. ASTRAY G., GONZALEZ - BARREIRO C., MEJUTO J.C., RIAL - OTERO R., SIMAL - GÁNDARA J. A review on the use of cyclodextrins in food. Food Hydrocolloids. 23: 1631-1640 (2009).
25. BREWSTER M. E. AND LOFTSSON T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews. 59: 645-666 (2007).
26. MARTIN DEL VALLE E. M. Cyclodextrins and heir uses: a review. Process Biochemistry. 39: 1033-1046. (2004).
27. JULLIAN C., MOYANO L., YAÑEZ C., OLEA-AZAR C. Complexation of quercetina with three kinds of cyclodextrins: An antioxidante study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 67: 230-234 (2007).
28. ASUERO A. AND SAYAGO. Spectrophotometric evaluation of stability constant of 1:1 weak complexes from continuous variation data. International Journal of Pharmaceutic 321: 94-100 (2006).
29. LI J., ZHANG M., CHAO J., SHUANG S. Preparation and characterization of the inclusion complex of Baicalin (BG) with β -CD and HP- β -CD in solution: An antioxidant ability study. Spectrochimica Acta Part A. 73: 752-756 (2009).
30. NUÑEZ- DELICADO E., LUCAS-ABELLÁN C., MERCADER-ROS M. T., ZAFRILLA M. P., FORTEA M. I. AND GABALDÓN J. A. ORAC- Fluorescein assay to determinate the Oxigen Radical Absorbance Capacity in cyclodextrins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 2254-2259 (2008).
31. NUÑEZ-DELICADO E., LUCAS-ABELLÁN C., FORTEA I. and GALBALDÓN J.A. Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 255-259 (2008).
32. LÓPEZ-ALARCÓN C. & LISSI E. A nobel and simple ORAC methodology base don the interaction of Pyrogallol Red with peroxilo radicals. Free Radical Research. 40:979-985 (2006).

33. VILLAÑO D., FERNÁNDEZ- PACHÓN M.S., MOYÁ M.L., TRONCOSO A. M., GARCÍA – PARRILLA M.C. Radical scavenging ability of polyphenolis compounds towards DPPH free radical. Talanta 71:230-235 (2007).
34. POLOVKA M., BREZOVÁ V., STASKO A. Antioxidant properties of tea investigated by EPR. Spectroscopy Biophysical Chemistry. 106: 39-56 (2003).
35. MCPHAIL D. B., HARTLEY R. C., GARDNER P.T., AND DUTHIE G.G. Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 1684-1690 (2003).
36. ZHANG H.-Y., WANG L.-F. AND SUN Y.-M. Why B-Ring is the active center for Genistein to scavenge peroxilo radical: A DFT study. Biorganic & Medicinal Chemistry Letters. 13: 909-911 (2003).
37. TROUILLAS P., MARSAL P., SIRI D., LAZZARONI R., DUROUX J.-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetina and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. Food Chemistry. 97: 679-688 (2006).
38. LEOPOLDINI M., PITARCH I. P., RUSSO N., AND TOSCANO M. Structure, conformation and Electronic properties of apigenin, luteolin and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. Journal of Physical Chemistry A. 108: 92-96 (2004).
39. Jullian Carolina. Estudio de compuestos de inclusión de ciclodextrinas con flavonoides. Efecto sobre su actividad antioxidante. Tesis Doctor en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas, 2007.

ANEXO 1

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE APIGENINA Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

ORAC _{FL}	Pendiente PROMEDIO	r ² PROMEDIO	T _{EQ}
Trolox	2,64x10 ⁶	0,992	1
Apigenina	2,21 x10 ⁷	0,990	8,34 ± 0,37
β- Apigenina	3,85 x10 ⁷	0,992	14,56 ± 0,5
DM-β- Apigenina	3,65 x10 ⁷	0,989	13,81 ± 0,51
HP-β- Apigenina	3,96 x10 ⁷	0,994	14,99 ± 0,26

ORAC _{PGR}	Pendiente PROMEDIO	r ² PROMEDIO	T _{EQ}
Trolox	9,97 x 10 ⁶	0,922	1
Apigenina	-	-	-
β- Apigenina	-	-	-
DM-β-Apigenina	1,13 x 10 ⁸	0,995	11,36 ± 0,14
HP-β- Apigenina	6,02 x 10 ⁷	0,965	8,99 ± 0,52

DPPH	Velocidad Inicial (ηM/s) [1,15E-07 M] API _{constante}	n: hidrógenos lábiles
Apigenina	5,57	1
βcd – Apigenina	18,20	1
Dmβcd –Apigenina	13,80	1
Hpβcd - Apigenina	22,10	1

ANEXO 2

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE GALANGINA Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

ORAC _{FL}	Pendiente PROMEDIO	r ² PROMEDIO	T _{EQ}
Trolox	2,64 x 10 ⁶	0,992	1
Galangina	1,22 x 10 ⁷	0,978	4,63 ± 0,33
β- Galangina	3,84 x 10 ⁶	0,988	1,45 ± 0,15
DM-β- Galangina	8,84 x 10 ⁶	0,993	3,34 ± 0,25
HP-β- Galangina	1,18 x 10 ⁷	0,976	4,47 ± 0,15

ORAC _{PGR}	Pendiente PROMEDIO	r ² PROMEDIO	T _{EQ}
Trolox	9,97 x 10 ⁶	0,922	1
Galangina	-	-	-
β- Galangina	-	-	-
DM-β- Galangina	-	-	-
HP-β- Galangina	-	-	-

DPPH	Velocidad Inicial (ηM/s) [5,84E-08M] GAL _{constante}	n: Hidrógenos lábiles
Galangina	4,82	1
βcd – Galangina	8,36	1
Dmβcd -Galangina	9,30	1
Hpβcd - Galangina	8,45	1

ANEXO 3

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CANFEROL Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

ORAC _{FL}	Pendiente PROMEDIO	r ² PROMEDIO	T _{EQ}
Trolox	2,64 x 10 ⁶	0,992	1
Canferol	2,62 x 10 ⁷	0,997	9,91 ± 0,24
β- canferol	3,16 x 10 ⁷	0,998	11,95 ± 0,25
DM-β-canferol	3,05 x 10 ⁷	0,987	11,53 ± 0,35
HP-β- canferol	3,40 x 10 ⁷	0,995	12,85 ± 0,03

ORAC _{PGR}	Pendiente PROMEDIO	r ² PROMEDIO	T _{EQ}
Trolox	9,97 x 10 ⁶	0,922	1
canferol	8,77 x 10 ⁷	0,991	8,79 ± 0,24
β- canferol	1,36 x 10 ⁸	0,997	13,64 ± 0,64
DM-βcanferol	1,20 x 10 ⁸	0,989	12,04 ± 0,91
HP-β- canferol	7,56 x 10 ⁷	0,997	9,71 ± 0,09

DPPH	Velocidad Inicial (ηM/s) [3,98E-08 M] KAEM _{constante}	n: Hidrógenos lábiles
Canferol	6,80	1
βcd - canferol	6,59	1
Dmβcd - canferol	7,56	1
Hpβcd - canferol	6,75	1