

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE
EXTRACTOS DE *Erythroxylum coca* Lam. y *Coffea arabica* L. EN UN
SISTEMA LIPÍDICO MODELO**

FAUSTO PRADA CHAPARRO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE
EXTRACTOS DE *Erythroxylum coca* Lam. y *Coffea arabica* L. EN UN
SISTEMA LIPÍDICO MODELO**

FAUSTO PRADA CHAPARRO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para obtener el título de Químico**

Directora:

ELENA E. STASHENKO

Química Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2004

ABREVIATURAS

- AA:** Actividad antioxidante
- ABTS^{•+}:** Cation radical 2,2-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ALH:** Ácido linoleico
- BHA:** Butilhidroxianisol
- BHT:** Butilhidroxitolueno
- CCV:** Compuestos carbonílicos volátiles
- CIBIMOL:** Centro de Investigación en Biomoléculas
- DPPH[•]:** Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
- EPA:** Environmental Protection Agency (Agencia de protección ambiental)
- EPC:** Efecto Protector Corregido
- μ-ECD:** Micro-Electron Capture Detector (Micro detector de captura de electrones)
- EDTA:** Ethylenediaminetetracetic Acid (Ácido etilendiaminotetracético)
- ERO's:** Especies reactivas de oxígeno
- FAME's:** Fatty acid metil esters (Metilésteres de ácidos grasos)
- FID:** Flame Ionization Detector (Detector de ionización en llama)
- GSH:** Glutación
- HRGC:** High Resolution Gas Chromatography (Cromatografía de gases de alta resolución)
- HPLC:** High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
- MDA:** Malondialdehído
- MSD:** Mass Selective Detector (Detector selectivo de masas)
- NPD:** Nitrogen Phosphorous Detector (Detector selectivo de nitrógeno-fósforo)
- OEA:** Organización de Estados Americanos

PDMS/DVB: Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno

PFPH: Pentafluorophenylhydrazine (Pentafluorofenilhidracina)

PL: Peroxidación lipídica

QSAR: Quantitative Structure–Activity Relationship (Relación cuantitativa entre actividad-estructura)

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sodio)

SFE: Supercritical Fluid Extraction (Extracción con fluido supercrítico)

SOD: Superóxido dismutasa

HS-SPME: Head Space – Solid-Phase Microextraction (Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza)

TBA: Tiobarbituric Acid (Ácido tiobarbitúrico)

TBHQ: *ter*-Butil hidroquinona

TIC: Total Ion Current (Corriente iónica total)

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografía de capa fina)

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1 LAS ESPECIES RADICALARIAS	6
1.2 PRODUCCIÓN Y CONSECUENCIAS DE LAS ESPECIES RADICALARIAS	10
1.3 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	13
1.4 CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	24
1.5 SISTEMAS MODELO PARA MEDIR LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	30
1.6 <i>Coffea arabica</i> L.	36
1.7 <i>Erythroxylum coca</i> Lam.	38
2. PARTE EXPERIMENTAL	43
2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO	43
2.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	46
2.3 DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DE LOS t_R Y LAS ÁREAS CROMATOGRÁFICAS	47
2.4 EXTRACCIÓN SOXHLET DE HOJA DE COCA Y GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO Y ANÁLISIS POR HRGC/MSD DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS	47

2.5	SFE DE HOJA DE COCA Y GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO Y ANÁLISIS POR HRGC/MSD DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS	49
2.6	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS EVAPORADOS DE HOJA DE COCA Y GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO, COCAÍNA, CAFEÍNA, VITAMINA E Y BHA, EN UN SISTEMA LIPÍDICO MODELO	50
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.1	DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DE LOS t_R Y LAS ÁREAS CROMATOGRÁFICAS	58
3.2	SISTEMA LIPÍDICO MODELO: OXIDACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO INDUCIDA POR IONES Fe^{2+} EN BUFFER DE TRIZMA	58
3.3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE COCA, GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO, CAFEÍNA, COCAÍNA VITAMINA E Y BHA	61
4.	CONCLUSIONES	86
5.	RECOMENDACIONES	87
6.	BIBLIOGRAFÍA	88
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estados energéticos del oxígeno molecular.	7
Figura 2. Reducción secuencial y univalente del oxígeno.	8
Figura 3. Energías y tiempos de los estados activos del oxígeno.	8
Figura 4. La adición del oxígeno al enlace doble de un ácido graso insaturado.	9
Figura 5. Aducto de la reacción del 13-hidroperóxido con N-acetilcisteína.	12
Figura 6. Esquema de oxidación del ácido linoleico.	19
Figura 7. Escisión β del 13-hidroperóxido. Formación del hexanal.	20
Figura 8. Cambios en los lípidos durante el proceso de fritura.	22
Figura 9. Antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimenticia.	26
Figura 10. Antioxidantes naturales más conocidos.	28
Figura 11. Algunas reacciones involucradas en la actividad antioxidante de los antioxidantes primarios, e.g. γ -tocoferol.	29
Figura 12. Productos derivados del daño causado por radicales libres. Principales marcadores para medir <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> el grado de peroxidación.	32
Figura 13. Reacción del TBA con el MDA.	34
Figura 14. Estructura química de la cafeína.	38

Figura 15. Estructura química de la cocaína.	39
Figura 16. Equipo de extracción Soxhlet.	48
Figura 17. Equipo de extracción con fluido supercrítico (SFE). Soxhlet de alta presión (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.).	49
Figura 18. Equipo de microextracción en fase sólida (SPME).	53
Figura 19. Reacción de los aldehídos con las hidracinas y formación de hidrazonas.	58
Figura 20. Estudio del proceso de peroxidación lipídica: A. Generación del hexanal inducida por la oxidación de ALH a pH 7.4, 37°C en presencia de Fe ²⁺ y B. Cinética de la producción de dienos conjugados durante la oxidación de ALH a pH 6.4, 30°C.	61
Figura 21. Efecto de la adición del extracto de hoja de coca sobre la cantidad del hexanal generado (medido como su derivado-PFPH), producido en la emulsión de ácido linoleico, sometida a la oxidación (Fe ²⁺). A. Blanco de ácido linoleico; B. Ácido linoleico + Extracto (5 g/L); C. Ácido linoleico + Extracto (20 g/L).	63
Figura 22. Efecto protector de la vitamina E sobre la cantidad del ácido linoleico (medido como su metiléster) remanente en la emulsión sometida a la oxidación (Fe ²⁺) A. Ácido linoleico inicial; B. Ácido linoleico sin vitamina E; C. Ácido linoleico + vitamina E (1 g/L) y D. Ácido linoleico + vitamina E (20 g/L).	64
Figura 23. Actividad antioxidante, expresada en “Equivalentes de vitamina E” para el BHA, los extractos de grano de café tostado y molido y hoja de coca, cafeína y cocaína. Método de medición: derivación del hexanal con PFPH y extracción con hexano del derivado por LLE.	69

- Figura 24.** Actividad antioxidante, expresada en “Equivalentes de vitamina E” para el BHA, los extractos de grano de café tostado y molido, hoja de coca, la cafeína y la cocaína. Derivación con PFPH sobre la fibra y extracción del derivado de hexanal usando HS-SPME. **70**
- Figura 25.** Actividad antioxidante, expresada en “Equivalentes de vitamina E” para el BHA, los extractos de grano de café tostado y molido, hoja de coca, cafeína y cocaína. Medición de la cantidad remanente del ácido linoleico en forma de su metiléster, según la fórmula de la ecuación 5 (Sección 2.6.3). **71**
- Figura 26.** Perfil característico de metilésteres de ácidos grasos presentes en los extractos Soxhlet obtenidos de: **A.** Grano de café tostado y molido; **B.** Hoja de coca. Columna DB-WAX [poli(etilenglicol)]. (60 m). FID. **73**
- Figura 27.** Corriente iónica total reconstruida del extracto Soxhlet de hoja de coca. Columna HP-5MS (60 m), MSD. EI (70 eV). **75**
- Figura 28.** Corriente iónica total reconstruida del extracto de hoja de coca obtenido por SFE. Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV). **76**
- Figura 29.** Corriente iónica total reconstruida de grano de café tostado y molido obtenido por extracción Soxhlet. Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV). **77**
- Figura 30.** Corriente iónica total reconstruida de grano de café tostado y molido obtenido por SFE. Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV). **78**
- Figura 31.** Corriente iónica total reconstruida de la cocaína (**A**) y su respectivo espectro de masas (**B**), donde aparecen estructuras correspondientes a los iones característicos ($M^{+\bullet}$, m/z 182 y m/z 82). Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV). **83**

Figura 32. Corriente iónica total reconstruida de la cafeína (A) y su respectivo espectro de masas (B), donde aparecen estructuras correspondientes a los iones característicos ($M^{+\bullet}$, m/z 136 y m/z 109). Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV).

84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los lípidos.	14
Tabla 2. Energía de disociación de algunos enlaces de hidrógeno.	17
Tabla 3. Compuestos volátiles formados durante la degradación de ácidos grasos insaturados.	20
Tabla 4. Métodos químicos e instrumentales más comunes para la determinación de la peroxidación lipídica.	33
Tabla 5. Datos estadísticos de producción y exportación de café en Colombia durante 1996 y 2002.	37
Tabla 6. Datos estadísticos sobre el decomiso de la cocaína, producida en Colombia, según la Dirección Nacional de Estupefacientes y la OEA.	41
Tabla 7. Volúmenes usados para la preparación de las soluciones en la evaluación de la AA de la vitamina E, el BHA, los extractos evaporados de hoja de coca y grano de café tostado y molido, la cocaína y la cafeína.	51
Tabla 8. Estudio de la repetibilidad en los t_R y las áreas cromatográficas del hexanal y de algunos ácido grasos.	59

Tabla 9. Incremento del hexanal y disminución del sustrato lipídico (ALH) provocados por la oxidación con Fe^{2+} del ácido linoleico después de la adición de las sustancias bajo estudio en diferentes concentraciones.	65
Tabla 10. Análisis cuantitativo de ácidos grasos de los extractos de grano de café tostado y molido y hoja de coca.	81
Tabla 11. Efecto protector corregido del extracto etanólico de grano de café tostado y molido.	82

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Activación del oxígeno triplete a singulete por la acción de sensibilizadores.	9
Esquema 2. Reacciones catalizadas por los metales de transición que inducen la formación de especies radicalarias.	11
Esquema 3. Reacciones de formación del radical hidroxilo inducidas por los iones de metales de transición.	11
Esquema 4. Etapa de iniciación del proceso de peroxidación lipídica.	16
Esquema 5. Reacciones de propagación durante la peroxidación lipídica.	16
Esquema 6. Reacciones de finalización de la peroxidación lipídica.	18
Esquema 7. Reacciones llevadas a cabo por GSH durante la protección del ADN y la regeneración de α -tocoferol.	29

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Erythroxylum coca* Lam. y *Coffea arabica* L. EN UN SISTEMA LIPÍDICO MODELO*

AUTOR: FAUSTO PRADA CHAPARRO**

PALABRAS CLAVES: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, *Erythroxylum coca* Lam., *Coffea arabica* L., SISTEMA LIPÍDICO MODELO, ÁCIDO LINOLEICO, COCAÍNA y CAFEÍNA.

La peroxidación lipídica (PL), es la principal causa de degradación y, por lo tanto, de la producción del mal olor y sabor de los alimentos (*off-flavor*), además, de disminuir la calidad nutricional y generar compuestos tóxicos en los productos. En el cuerpo humano, la formación de especies radicalarias por reacciones de oxidación, se relaciona con enfermedades coronarias, cáncer, asma y envejecimiento prematuro. Por esto es necesario el uso de compuestos que eviten o retarden la PL. Estos compuestos se llaman antioxidantes.

En esta investigación se evaluó la actividad antioxidante (AA) *in vitro* de extractos etanólicos de hojas de *Erythroxylum coca* Lam. y su principal alcaloide la cocaína; y de los granos tostados y molidos de *Coffea arabica* L. y su alcaloide cafeína. Se utilizó como sistema lipídico modelo la oxidación del ácido linoleico (ALH) por iones Fe^{+2} . Se usó como método, la cuantificación del hexanal liberado de la oxidación del ALH y la cantidad de ácido graso remanente después del proceso de oxidación mediante GC. El aldehído se aisló de la fase condensada por extracción líquido-líquido con hexano y de la fase vapor por micro-extracción en fase sólida (HS-SPME) y se analizó como su derivado pentafluorofenilhidazónico mediante GC con detector de captura de electrones. Para la validación del modelo lipídico se estudió la AA de la vitamina E y el butilhidroxianisol (BHA).

La HS-SPME fue la herramienta más rápida y sencilla para la determinación de compuestos carbonílicos y su relación con la AA. Para todas las concentraciones estudiadas, la AA *in vitro* del extracto de hoja de coca fue similar o superior a la de la vitamina E y del BHA. En general, las sustancias estudiadas exhibieron la AA *in vitro* en el siguiente orden descendente: Extracto de hoja coca \geq Vitamina E \geq BHA > Extracto de grano de café tostado y molido > cafeína \geq cocaína.

* Trabajo de Grado
** Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Programa de Química
Elena E. Stashenko

SUMMARY

TITLE: *In vitro* ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION OF *Erythroxylum coca* Lam. AND *Coffea arabica* L. EXTRACTS IN A LIPIDIC MODEL SYSTEM*

AUTHOR: FAUSTO PRADA CHAPARRO**

KEYWORDS: ANTIOXIDANT ACTIVITY, *Erythroxylum coca* Lam., *Coffea arabica* L., LIPIDIC MODEL SYSTEM, LINOLEIC ACID, COCAINE, and CAFFEINE.

The lipid peroxidation (PL) is the main causes of degradation and the production of food off-flavor, to decrease nutritional quality and to generate toxic compounds in those products. In the human body, the formation of radical species from oxidation reactions is related with many medical diseases such as cancer, asthma and the premature aging. For this reason, it is necessary the use of compounds that avoid or retard the PL. These compounds are called antioxidants.

The aim of this investigation was to evaluate the *in vitro* antioxidant activity (AA) of ethanolic extracts of *Erythroxylum coca* Lam. leaves and *Coffea arabica* L. beans and, its main alkaloids, cocaine and caffeine, respectively. It was used a lipidic model system that consisted in the oxidation of linoleic acid (ALH) by iron ions. The method used to evaluate the AA was to quantify the hexanal liberated by the oxidation of ALH and, also the quantification of the fat acid after the oxidation reaction using GC. The aldehyde was isolated from the condensed phase by liquid-liquid extraction (hexane) and, from the vapor phase by solid phase micro-extraction (HS-SPME) as its pentofluorophenylhydrazone derivate using GC with electron capture detection. The lipidic model was validated studying the AA of vitamin E and butylhydroxyanisole (BHA).

The HS-SPME was the fastest and easiest tool for the determination of carbonyl compounds and its relation with the AA. For all concentrations studied, the AA of the extract of *Erythroxylum coca* Lam. leaves was similar or better than the vitamin E and BHA. The substances studied showed an *in vitro* AA in the following decrease order: *Erythroxylum coca* Lam. leaves extract \geq vitamin E \geq BHA > *Coffea arabica* L. beans extract > caffeine \geq cocaine.

* Work of degree
** Faculty of Sciences
School of Chemistry
Program of Chemistry
Elena E. Stashenko

INTRODUCCIÓN

Es contradictorio que el oxígeno, el elemento que nos da la vida, bajo ciertas condiciones también la ayuda a destruir. El problema es que oxida las moléculas orgánicas, entre las cuales se encuentran hidrocarburos y sus derivados, tejidos animal o vegetal y los alimentos. La ventaja es que en condiciones normales el proceso oxidativo es lento, pero se puede acelerar por medio de la temperatura, radiación y catalizadores.

El proceso de la oxidación de moléculas lipídicas se denomina **peroxidación lipídica** (PL), que implica reacciones del oxígeno y sus especies reactivas con los sustratos lipídicos, por mecanismos de formación de especies radicalarias. Los radicales y otras especies reactivas de oxígeno (ERO's), las cuales se generan durante el metabolismo normal en el cuerpo humano y por fuentes exógenas, como el humo del cigarrillo, la radiación, la polución y los xenobióticos [1,2], han sido tema polémico y de discusión muy activa en los últimos años, puesto que se considera que están relacionadas con el envejecimiento prematuro, enfermedades coronarias, cáncer y asma. La degradación oxidativa es una de las principales causas del deterioro, de la aparición de olores y sabores indeseables (*off-flavour*), pérdida de la aceptación y el decrecimiento de la seguridad y calidad nutricional del producto, por la formación de compuestos potencialmente tóxicos durante el procesamiento o la preparación de los alimentos [3].

Para evitar este deterioro, los organismos vivos han desarrollado un complejo sistema de defensa para prevenir, detener y reparar el efecto de los daños por radicales libres. Este mecanismo incluye proteínas que “secuestran” los iones de metales de

transición, enzimas, vitamina E, carotenos, glutatión y peroxidasa, entre otros. En los alimentos, la adición de antioxidantes sintéticos, tales como el 2-*ter*-butil-4-metoxifenol (BHA), el 2,6-di-*ter*-butil-*p*-hidroxitolueno (BHT) y los alquilos de galato, es muy común industrialmente [4]. Sin embargo, estas sustancias han mostrado ser potencialmente dañinas para la salud [5]. Por esto, es de amplio interés entre los investigadores la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales como alternativa a los compuestos sintéticos. Los antioxidantes naturales se pueden encontrar en bebidas cítricas, vinos, frutas, té y extractos provenientes de hortalizas y plantas no comestibles [3,6–8]. Sin embargo, hay mucho camino por recorrer en esta área, es decir, existen muchas plantas con propiedades biológicas aún sin explorar. La inmensidad de la flora colombiana promete nuevas fuentes de antioxidantes. En esta investigación se estudiaron los extractos de dos plantas de mucha importancia socioeconómica para el país, como lo son la *Erythroxylum coca* Lam. y *Coffea arabica* L. conocidas comúnmente como “coca” y “café”, respectivamente y, sus alcaloides correspondientes, la cocaína y la cafeína.

Es necesario encontrar una solución alternativa a la destrucción masiva de bosques vírgenes en las montañas colombianas debido a la siembra de coca y, la contaminación de suelos y aguas como consecuencia de las fumigaciones, el procesamiento y producción de la cocaína. Según la Dirección Nacional de Estupefacientes, hasta 1999 en Colombia existían más de 122.500 ha con plantaciones de coca sembradas y en el año 2000 se incautaron más de 110.552 kg de cocaína lo que genera el consumo de más de 200.000 toneladas de insumos químicos por año, entre los cuales se encuentran gasolina, cemento, ácido sulfúrico, herbicidas e insecticidas.

Según el Plante, en 1995 las políticas de lucha contra la producción, tráfico y consumo de cocaína le costaron al estado colombiano más de 984 millones de dólares, lo que equivalió al 5 % del presupuesto nacional. En 1999 los costos de fumigación de una ha fueron de 9.822'144.445.5 pesos y, sin embargo, el área de los

cultivos se triplicó. Pero el costo para la nación y el campesino, va más allá del precio de los productos químicos utilizados, tanto en la extracción de la cocaína, como en las fumigaciones. Las fumigaciones poseen efectos desastrosos sobre la biodiversidad y los cultivos lícitos, causan el desplazamiento de los cultivos a nuevas áreas vírgenes, de tal manera, que por cada ha de coca sembrada, se destruyen 4 ha de vegetación natural [9]. Por estas razones, es imprescindible encontrar alternativas viables legales al cultivo de la coca para preservar y mejorar nuestras reservas naturales y culturales, y que beneficien a la mayor parte de los involucrados, pero especialmente al país.

De otro lado, el café colombiano, uno de los mejores en el mundo, el cual es segundo producto de exportación después del petróleo (6.22 % de la exportación total en el 2001) y sustenta a más de 350.000 familias (4'000.000 personas) merece recibir una especial atención, sobre todo porque en los últimos 5 años ha disminuido su exportación [10,11]. El objetivo es encontrar en el café colombiano nuevas propiedades biológicas y aumentar la calidad, dando así mayor valor agregado al producto.

Hasta el momento, no se ha conocido, revisando la literatura científica, alguna investigación que reporte la evaluación de la actividad antioxidante (AA) de los extractos etanólicos de hoja de coca. En cambio, el café ha recibido bastante atención por ser un producto de consumo mundial. Se ha investigado la AA de diferentes especies, diferentes grados de tueste en sistemas de β -caroteno-ácido linoleico (ALH) [12], de bebidas preparadas [13,14] y de los compuestos volátiles generados por las reacciones de Maillard [15], pero no de los extractos etanólicos de grano de café tostado y molido, en un sistema lipídico como el empleado en la presente investigación (oxidación de ALH inducida por iones Fe^{2+}).

Toda la metodología de este trabajo se desarrolló con base en el conocimiento adquirido durante varios años de investigación del Laboratorio de Cromatografía

(adscrito al Centro de Investigaciones en Biomoléculas, CIBIMOL). En este tiempo, se han estandarizado técnicas de análisis cromatográfico en diferentes áreas de aplicación, tales como ciencias forenses, petróleo, polímeros, química analítica, ambiental, alimentos, productos naturales y antioxidantes. En esta última área se han generado varios proyectos de pregrado [16–18], maestría [19–21] y uno de doctorado [22], en los cuales se han implementado sistemas modelo para medir la AA, metodologías para la extracción, derivación y cuantificación de compuestos carbonílicos volátiles (CCV) por diferentes métodos, tales como extracción en fase sólida, líquido-líquido (LLE) y una novedosa técnica de análisis, consistente en la extracción, concentración y derivación (*in situ*) simultánea, a saber, microextracción en fase sólida (SPME). Detectores selectivos de nitrógeno-fósforo (NPD), captura de electrones (ECD) y de masas (MSD) [23,25] sirven como herramientas sensibles y específicas en todos los análisis, este trabajo no es la excepción. Además, se ha investigado la determinación de ácidos grasos por HRGC/FID provenientes de diferentes matrices, por derivación a sus respectivos metilésteres [16].

Este trabajo se enfocó principalmente en evaluar la AA de extractos etanólicos (sistema Soxhlet para la extracción) de hoja de coca y grano de café tostado y molido, la cocaína y la cafeína, en concentraciones de 1, 5, 10 y 20 g/L. La AA se determinó en un sistema lipídico modelo implementado en el Laboratorio y basado en la oxidación del ALH inducida por iones Fe^{2+} en solución amortiguadora de trizma [19,20]. La AA se midió usando HRGC para cuantificar el hexanal (principal producto secundario de la peroxidación del ALH). El hexanal se derivatizó previamente con pentafluorofenilhidracina (PFPH) y se detectó, usando un microdetector de captura de electrones (μ -ECD). El hexanal se cuantificó en la fase condensada por extracción líquido-líquido (LLE) [23] y en la fase vapor por microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME) [25]. Igualmente, se determinó la AA, cuantificando la pérdida de material lipídico después del proceso de PL, convirtiendo el ALH a su respectivo metiléster y analizándolo por HRGC con detector de ionización en llama (FID) [16].

Los estudios demostraron buena capacidad de los extractos de hoja de coca para evitar la oxidación del ALH, similares a la de la vitamina E y del BHA (sustancias con reconocida AA usadas como referencia en este trabajo). La AA para los extractos, los alcaloides y las sustancias de referencia (concentración de 20 g/L) en orden decreciente, fue así: hoja de coca \geq vitamina E \geq BHA > grano de café tostado y molido > cafeína \geq cocaína. Los resultados obtenidos en el sistema lipídico modelo permiten estimar la capacidad del sustrato para inhibir la PL *in vitro* inducida por iones Fe²⁺. Sin embargo, aún no se posee la información acerca de cómo actuarían estas sustancias *in vivo*, es decir, ello podría ser el próximo paso a dar en la investigación, que comienza con el presente trabajo.

Resultados parciales de este trabajo se presentaron como posters en los siguientes congresos: “XII Congreso Colombiano de Química”, Bogotá, Septiembre 5 – 7 de 2001; “IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, COLACRO IX, y III Congreso Colombiano de Cromatografía”, Cartagena de Indias, Febrero 20-22 de 2002.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LAS ESPECIES RADICALARIAS

Los procesos de transformación de la materia y energía fundamentales para la vida, constan de reacciones fisicoquímicas de oxido-reducción, que suceden en perfecto orden y armonía. Sin embargo, existen varios factores (presencia de radicales) que inducen un desplazamiento hacia la oxidación, provocando el llamado “estrés oxidativo” [26]. Las proteínas, los carbohidratos, los ácidos nucleicos y los lípidos, que se encuentran de manera variada y abundante en todos los sistemas vivos, pero principalmente en el humano; son los más susceptibles a ser degradados por las ERO's. Entre las últimas figuran el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidropéroxido (HO_2^{\cdot}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno en estado singlete (1O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Además, hay que considerar la exposición a los productos de la contaminación ambiental, humo de tabaco, hidrocarburos aromáticos, algunos fármacos, la radiación ionizante y ultravioleta [1,27], los xenobióticos, tales como los herbicidas, fungicidas y plaguicidas y, los radicales peroxi y alcoxi de procedencia exógena, como los alimentos.

1.1.1 Los radicales y las especies reactivas de oxígeno: Los radicales, se definen según Gutteridge [4], como cualquier especie capaz de existir independiente y que contiene uno o más electrones desapareados. Los radicales se producen principalmente cuando una molécula pierde un electrón, al igual que por el rompimiento homolítico de un enlace covalente; como consecuencia, se forma una especie más reactiva que la de partida. Su generación es importante en los procesos de PL puesto que son capaces de activar moléculas que por sí solas no serían

reactivas e iniciar procesos degradativos que pueden conducir finalmente a la muerte celular [1].

La molécula de oxígeno es un birradical, posee dos electrones libres. Como tal, no es una especie altamente reactiva, debido a su configuración electrónica: los espines de sus orbitales más externos se encuentran en direcciones paralelas, es un estado normal triplete, $^3\text{O}_2$ (**Figura 1** Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

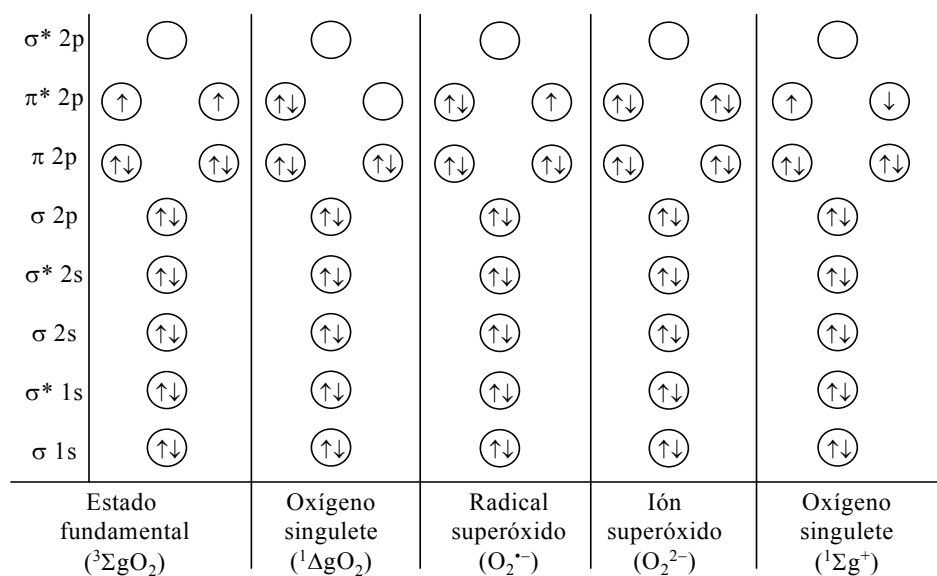


Figura 1. Estados energéticos del oxígeno molecular [1].

Para que el oxígeno pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese radical, los electrones deberían tener también los espines paralelos, lo que violaría el principio de exclusión de Pauli. De esta manera, para aumentar la reactividad del oxígeno, éste debe invertir el espín de uno de los electrones (pasar al estado “singlete”, $^1\Delta_g$), o sufrir una reducción secuencial produciendo otros radicales de oxígeno [1] (**Figura 2**).

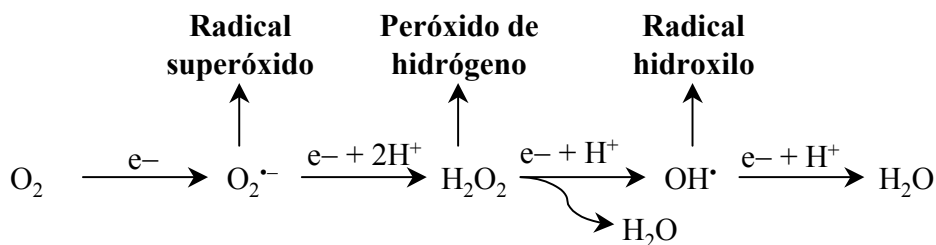


Figura 2. Reducción secuencial y univalente del oxígeno.

En primer lugar, cuando los espines son diferentes, pueden presentarse dos situaciones que originan dos formas de oxígeno singulete: el oxígeno singulete delta, $^1\Delta_g\text{O}_2$ (92 kcal/mol), que es el de mayor importancia biológica y tiene tiempo de vida media mayor, que el oxígeno singulete sigma, $^1\Sigma_g^+$ (155 kcal/mol), el cual es más reactivo que el anterior, con tiempo de vida media muy corta (**Figura 3**). En este estado se presenta una fuerte repulsión entre los electrones, el átomo de oxígeno se vuelve muy electrófilo y suficientemente reactivo como para unirse directamente a los ácidos grasos que se encuentran igualmente en estado singulete, por un mecanismo de “adición” (**Figura 4**) [1,3,5].

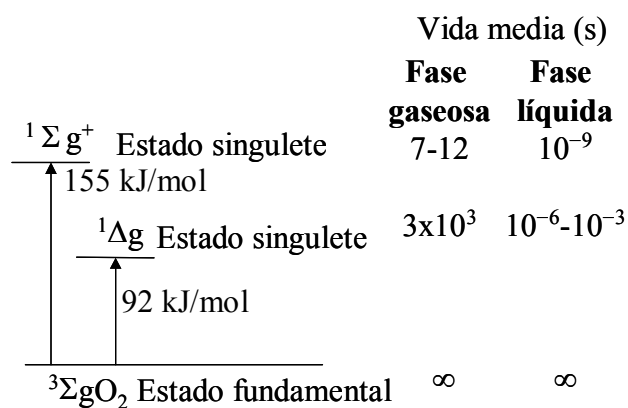


Figura 3. Energías y tiempos de los estados activos del oxígeno.

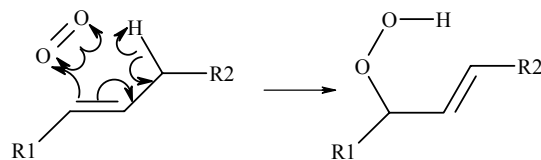
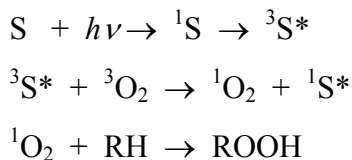


Figura 4. La adición del oxígeno al enlace doble de un ácido graso insaturado.

Generalmente, la formación de la especie reactiva del oxígeno se cataliza por la presencia de moléculas llamadas sensibilizadores, tales como la clorofila, las hematóporfirinas o flavinas, las cuales son capaces de convertir el oxígeno triplete en oxígeno singlete.

El fotosensibilizador absorbe la energía de la radiación visible o UV-cercano, posteriormente, el sensibilizador excitado transfiere esta energía al oxígeno triplete, dando lugar a la formación del oxígeno singlete (**Esquema 1**).



Esquema 1. Activación del oxígeno triplete a singlete por la acción de sensibilizadores. Donde: 1S es el estado singlete del receptor fotónico, ${}^1S^*$ es el receptor fotónico en estado singlete excitado, ${}^3S^*$ es el receptor fotónico en estado triplete excitado, 3O_2 es el oxígeno triplete normal, 1O_2 es el oxígeno en estado singlete y $h\nu$ es la energía de radiación visible o ultravioleta.

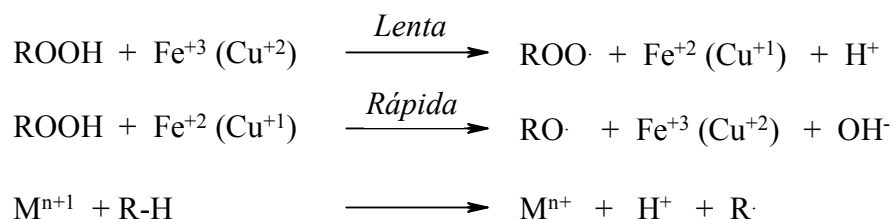
En segundo lugar, cuando existe reducción secuencial y univalente del oxígeno, es decir, un solo electrón interactúa con la molécula de oxígeno, se forma el ión radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que es una especie muy reactiva e inestable en soluciones acuosas.

Reacciona consigo mismo para producir peróxido. Si son dos los electrones que interactúan sobre la molécula de oxígeno, se forma el ión peróxido (O_2^{2-}), que es el mismo H_2O_2 , pero en forma deprotonada. El peróxido de hidrógeno es peligroso para las células, puesto que es un potente oxidante que atraviesa las membranas y genera el radical hidroxilo, OH^\bullet (**Figura 2**). OH^\bullet es la especie más reactiva que se conoce, con un radio de acción muy amplio. De tal forma, que generado en la mitocondria de una célula puede llegar a afectar otras a su alrededor. La generación de radicales hidroxilo es catalizada por los metales de transición [1].

1.2 PRODUCCIÓN Y CONSECUENCIAS DE LAS ESPECIES RADICALARIAS

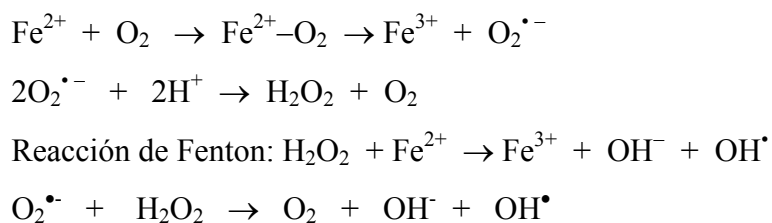
Las especies radicalarias se producen espontáneamente en las células durante la mayoría de los procesos redox, las reacciones microsomales, a través de la cadena de transporte mitocondrial (donde se genera la mayoría de los radicales), además, en las células fagocitosas, que se forman en la defensa contra microorganismos, las reacciones catalizadas por oxidasas y/o por metales de transición. Los hidroperóxidos también se pueden formar a través de una ruta de catálisis enzimática, en donde la lipoxigenasa interviene en la catálisis de la reacción entre el oxígeno y los lípidos poliinsaturados, actuando específicamente en la oxidación de los ácidos polieténicos que contienen metilenos entre los enlaces dobles que están en configuración *cis*, tales como los ácidos ALH, linolénico y araquidónico, pero no el ácido oleico.

1.2.1 Metales de transición. Los metales de transición están relacionados de dos formas con las reacciones de deterioro por radicales. En la primera, ellos pueden actuar como donadores o aceptores de electrones y reaccionar fácilmente con los hidroperóxidos (**Esquema 2**).



Esquema 2. Reacciones catalizadas por los metales de transición que inducen la formación de especies radicalarias.

Cuando se adicionan iones de metales de transición a sistemas que contengan peróxidos, éstos pueden actuar de dos maneras, la primera es descomponer los peróxidos en grupos peroxi y alcoxi, los cuales reaccionan con otros ácidos grasos y propagan la reacción de oxidación. En una segunda, los metales de transición como el hierro y el cobre pueden participar en la etapa de iniciación de las reacciones de PL. Por ejemplo, el ion Fe^{2+} puede ceder un electrón al oxígeno para generar Fe^{3+} y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (**Esquema 3**). Una de las especies que puede provocar este tipo de reacción es la hemoglobina, la cual contiene un anillo porfirínico con un átomo de hierro en el centro en estado de oxidación 2+. En el transporte del oxígeno se forma un complejo $[\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2]$, el cual genera una especie Fe^{3+} y $\text{O}_2^{\bullet-}$. Aunque la liberación de la especie radicalaria de oxígeno es muy escasa, bajo ciertas condiciones ésta puede desencadenar una serie de reacciones que finalizan en la generación del radical hidroxilo OH^\bullet , según el **Esquema 3** [2,7,29]:



Esquema 3. Reacciones de formación del radical hidroxilo inducidas por los iones de metales de transición.

Las alteraciones producidas por los radicales libres dependen del tipo de célula, la toxicidad de las especies radicalarias, su cantidad, la naturaleza del sustrato susceptible a la oxidación y la cantidad de antioxidantes. El daño oxidativo produce diversas alteraciones en las funciones biológicas de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (peroxidación lipídica).

1.2.2 Daño en las proteínas. Las proteínas son modificadas de diferentes maneras por las ERO's. Las proteínas con ligandos metálicos pueden reaccionar con el radical superóxido y/o el peróxido de hidrógeno que las convierten a sus formas inactivas; estudios sobre las interacciones de hidroperóxidos con proteínas han mostrado que en ausencia de oxígeno, el 13-hidroperóxido del ALH reacciona con N-acetilcisteína para dar un aducto, cuyo isómero se muestra en la **Figura 5**.

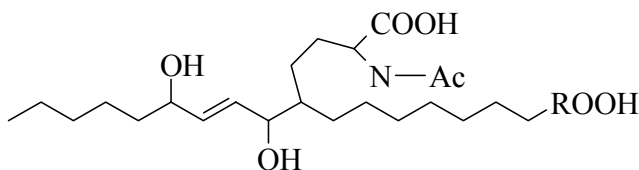


Figura 5. Aducto de la reacción del 13-hidroperóxido con N-acetilcisteína.

La acción de los radicales libres sobre las proteínas también puede generar subproductos que amplifican el daño inicial. La oxidación del triptófano genera un compuesto que reacciona con grupos amino y produce entrecruzamiento entre las proteínas y los lípidos. El deterioro de las proteínas produce alteraciones enzimáticas en la permeabilidad iónica de las membranas y la transducción de las señales intra e intercelulares [1,2].

En los alimentos, este tipo de reacciones conduce a los cambios en la estructura, generando el decrecimiento de la solubilidad de las proteínas, el color (pardeamiento) y los cambios del valor nutritivo (pérdida de los aminoácidos esenciales) [3,27].

1.2.3 **Pérdida de vitaminas.** La vitamina E (α -tocoferol) es el principal antioxidante natural que actúa en la prevención de la peroxidación lipídica en las grasas. Sin embargo, el ácido ascórbico (vitamina C), la vitamina A y los β -carotenos también presentan efectos antioxidantes en los alimentos. Todos los anteriores son consumidos en los procesos de PL (como antioxidantes), y pierden su función como vitaminas en los alimentos almacenados y/o procesados [27].

1.2.4 **Daño en ácidos nucleicos.** Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por especies radicalarias, especialmente por el OH^\bullet . Las modificaciones químicas de los nucleótidos pueden provocar la ruptura de las cadenas de ADN. Si el daño es tan grande que no puede ser corregido por el sistema de defensa antioxidante, se producen alteraciones genéticas o mutaciones, que están relacionadas con enfermedades autoinmunes y cáncer en el caso del ADN nuclear, mientras que los procesos de envejecimiento prematuro se asocian con los daños al ADN mitocondrial [1,2,30].

1.2.5 **Daño en los carbohidratos.** Los carbohidratos se deterioran en menor proporción que otras moléculas. Sin embargo, la autooxidación del manitol, ciertos oxiazúcares o glucosa puede favorecer la formación de especies radicalarias y peróxido de hidrógeno. Las modificaciones de los carbohidratos están relacionadas con patologías, tales como la diabetes, las enfermedades reumáticas y las cataratas [29].

1.3 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

1.3.1 **Lípidos.** La palabra "lípidos" es usada por los científicos para denotar un grupo químicamente heterogéneo de sustancias que tienen una propiedad común de

insolubilidad en agua, pero que son altamente solubles en mezclas y solventes no polares como cloroformo e hidrocarburos [5].

La palabra "lípidos" proviene del griego *lipos*, que significa grasa. Hay otros compuestos, como terpenos y carotenoides que también están incluidos en esta denominación. Sin embargo, algunos autores consideran como lípidos sólo aquellas moléculas que son derivados potenciales de los ácidos grasos y compuestos relacionados, con lo cual se excluyen terpenos, carotenoides y colesterol, pero no los ésteres de este último [5,28]. La clasificación de lípidos considera muy difícil y ambigua. En general, hay varios sistemas para clasificarlos. Uno de ellos se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de los lípidos.

A. Lípidos simples. Ésteres de ácidos grasos y alcoholes.
1. Grasas y aceites. Ésteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos.
2. Ceras. Ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.
B. Lípidos compuestos. Lípidos simples conjugados con moléculas no lipídicas
1. Fosfolípidos. Ésteres que contienen ácido fosfórico en lugar de ácido graso, combinado con una base de nitrógeno.
2. Glucolípidos. Compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrósidos.
3. Lipoproteínas. Compuestos de lípidos y proteínas.

C. Compuestos asociados.
1. Ácidos grasos (derivados de lípidos simples).
2. Pigmentos.
3. Vitaminas liposolubles.
4. Esteroles.
5. Hidrocarburos.

Los lípidos desempeñan varias funciones en los seres vivos. Por ejemplo, son parte constituyente de la membrana celular, componente en el transporte de algunos nutrientes, algunos son vitaminas y otras hormonas. Son la principal fuente energética de los organismos vivos y pueden suministrar 9 kcal por cada gramo de lípido. Sirven como aislantes naturales, puesto que son pobres conductores del calor, y pueden mantener la temperatura del cuerpo estable [5], especialmente, cuando las temperaturas del medio son muy bajas.

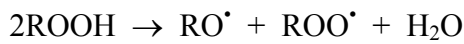
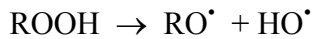
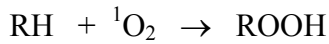
Los ácidos grasos saturados e insaturados son los lípidos más abundantes. Se encuentran en forma de triglicéridos (tres ácidos grasos unidos al glicerol por enlaces tipo éster) en las células de almacenamiento de vegetales y animales y fosfolípidos en las membranas biológicas. Sus propiedades varían de acuerdo con la cantidad y la posición de los enlaces dobles, que posee la molécula. Por ejemplo, a mayor número de insaturaciones, el punto de fusión disminuye, y siempre es menor que el de los respectivos ácidos grasos saturados.

1.3.2 Mecanismo de la peroxidación lipídica. Se han dedicado varios años de estudio a la elucidación del mecanismo de la reacción de PL, también conocida como autoxidación de lípidos [1,3,5]. Se presume, que la reacción consta de las siguientes tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación.

1.3.2.1 Etapa de iniciación. La etapa de iniciación involucra la formación de los radicales (R^\bullet) a partir del rompimiento homolítico y/o la sustracción de un hidrógeno metilénico de la cadena carbonada (**Esquema 4**), por la acción de ERO's, principalmente.

Los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles al ataque de los radicales, puesto que los enlaces dobles hacen el hidrógeno metilénico más lábil y, por ende,

más reactivo. La iniciación incluye también la formación de especies radicalarias (alcoxi y peroxi) a partir de hidroperóxidos ya formados en el proceso de PL, provocada principalmente por la presencia de iones metálicos, radiación y/o calentamiento.



Donde: RH – ácido graso susceptible a la oxidación

R[•]– radical

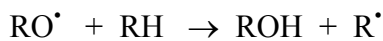
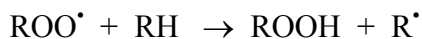
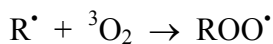
RO[•]– radical alcoxi

ROO[•] – radical peroxi

ROOH – hidroperóxido.

Esquema 4. Etapa de iniciación del proceso de peroxidación lipídica.

1.3.2.2 Etapa de propagación. Implica la formación de nuevos radicales a partir de los ya existentes, involucrando moléculas de ácidos grasos aún sin deteriorar (**Esquema 5**).

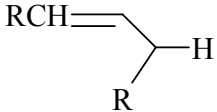
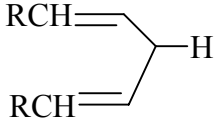
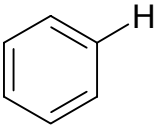


Esquema 5. Reacciones de propagación durante la peroxidación lipídica.

Después de la formación de los primeros radicales (R[•]), éstos reaccionan fácilmente con el oxígeno triplete (³O₂) y forman una radical peroxi (ROO[•]). Estas especies

extraen un H[•] metilénico de otro ácido graso (RH), para formar el hidroperóxido (ROOH). La abstracción de un H[•] del grupo metilénico (-CH₂-) es más fácil (76 kcal/mol), que el rompimiento del enlace ROO-H (88 kcal/mol) (**Tabla 2**) [27]. La propagación también se puede llevar a cabo por el rompimiento de los peróxidos ya formados en dos especies radicalarias, a saber peroxi y alcoxi (ROO[•] y RO[•]), capaces de extraer otro hidrógeno metilénico. La reacción de oxidación se mantiene mientras se disponga de sustrato lipídico para oxidar [27].

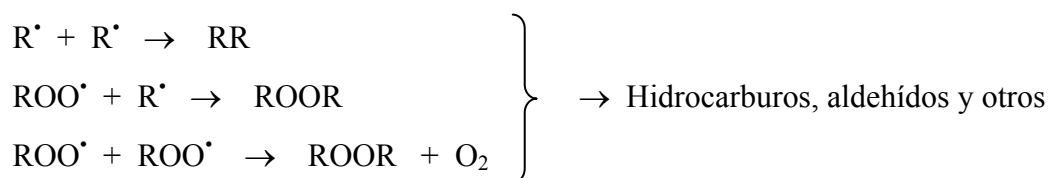
Tabla 2. Energía de disociación de algunos enlaces de hidrógeno [27].

Enlace	Energía de enlace (kcal/mol)
H-H	104.2
CH ₃ -H	104.3
R ₂ CH-H	96.3
	85
	76
	111
CH ₃ S-H	91.8
HO-H	119.3
ROO-H	88

1.3.2.3 Etapa de terminación: sucede cuando los radicales libres generados en la etapa de propagación, reaccionan con otro radical lipídico o un radical peroxi o alcoxi

(Esquema 6).

Cuando llega la etapa de terminación, los radicales peroxi, alcoxi y lipídicos reaccionan entre sí para dar especies no radicalarias, llamados productos primarios de la PL. La degradación de éstos puede generar los productos secundarios, tales como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y cetonas volátiles y no volátiles que imparten características odoríferas y físicoquímicas especiales a los productos con contenido lipídico [7].



Esquema 6. Reacciones de finalización de la peroxidación lipídica.

Gracias a las insaturaciones en la molécula especialmente, cuando hay dos enlaces dobles en posición 1,4-, los ácidos grasos son muy susceptibles a la oxidación natural o inducida, en donde se involucran los iones de metales de transición, la radiación ionizante y las ERO's.

Uno de los ácidos grasos más susceptible a la oxidación es el ácido linoleico (ALH), presente en la mayoría de los alimentos que se consumen a diario, especialmente, en la grasa del pollo y aceites de maíz, algodón, soya y girasol [5]. El ALH posee enlaces dobles en las posiciones 9 y 12, que debilitan el enlace C-H metilénico (76 kcal/mol) con respecto a un hidrógeno en una cadena saturada (96.3 kcal/mol) y facilitan la abstracción del hidrógeno del grupo metilénico del C₁₁, para formar el respectivo radical (AL•), estabilizado por deslocalización del electrón a través de los cinco átomos de carbono (**Figura 6**).

La distribución electrónica en el AL^\bullet permite la formación de dos híbridos de resonancia conjugados. En presencia de oxígeno (3O_2) se forman los correspondientes radicales peroxi 9- y 13- $ALOO^\bullet$, los cuales reaccionan con ácido graso ALH para propagar la reacción y generar los 9- y 13-hidroperóxidos, respectivamente. Los hidroperóxidos formados se descomponen para dar compuestos

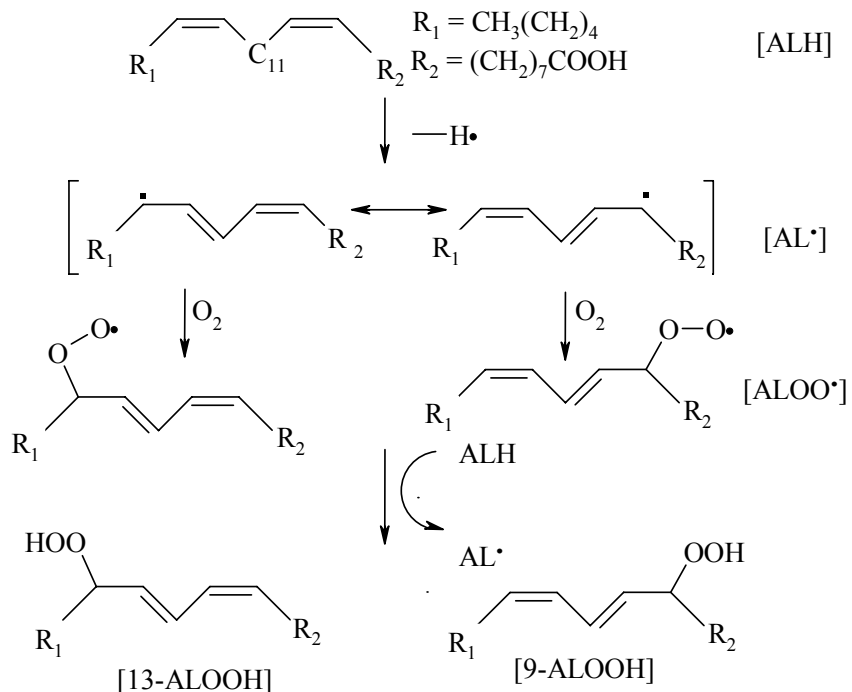


Figura 6. Esquema de oxidación del ácido linoleico.

de bajo peso molecular. El hexanal es el producto secundario más abundante formado a partir de la oxidación del ALH, posiblemente, por la vía de la escisión β del 13-hidroperóxido con la formación de un radical de corta vida y el grupo carbonilo.

La **Figura 7** muestra las dos posibilidades (A y B) de la escisión de los hidroperóxidos [3]. Sin embargo, el hexanal no es el único compuesto carbonílico formado. La **Tabla 3** muestra la gran cantidad de compuestos carbonílicos que se pueden generar a partir del calentamiento del ácido oleico, linoleico y linolénico [3].

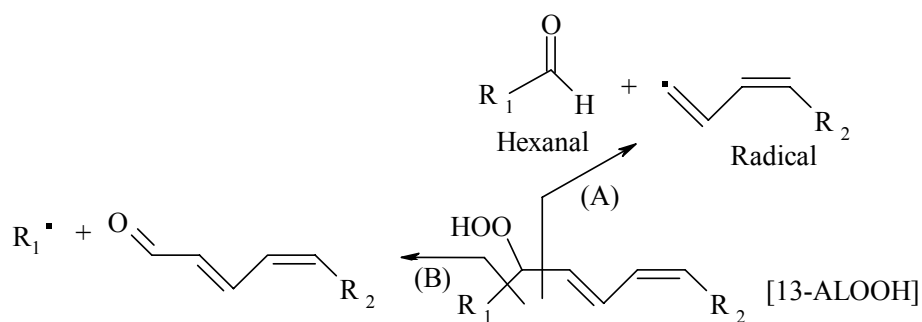


Figura 7. Escisión β del 13-hidroperóxido. Formación del hexanal.

Tabla 3. Compuestos volátiles formados durante la degradación de ácidos grasos insaturados [3].

Ácido oleico	($\mu\text{g/g}$) ^a	Ácido linoleico	($\mu\text{g/g}$)	Ácido linolénico	($\mu\text{g/g}$)
Heptanal	50	Pentano	- ^b	Propanal	-
Octanal	320	Pentanal	55	1-Penten-3-ona	30
Nonanal	370	Hexanal	5100	3- <i>trans</i> -Butenal	10
Decanal	80	Heptanal	50	2- <i>trans</i> -Pentenal	35
2- <i>trans</i> -Decenal	70	2- <i>trans</i> -Heptenal	450	2- <i>cis</i> -Pentenal	453
2- <i>trans</i> -Undecenal	85	Octanal	45	2- <i>trans</i> -Hexenal	10
		1-Octen-3-ona	2	3- <i>trans</i> -Hexenal	15
		1-Octen-3-hidroperóxido	- ^b	3- <i>cis</i> -Hexenal	90
		2- <i>cis</i> -Octenal	990	2- <i>trans</i> -Heptenal	5
		2- <i>trans</i> -Octenal	420	2- <i>trans</i> -4- <i>cis</i> -	320
		3- <i>cis</i> -Nonenal	30	Heptadienal	
		3- <i>trans</i> -Nonenal	30	2- <i>trans</i> -4- <i>trans</i> -	70
		2- <i>cis</i> -Nonenal	- ^b	Heptadienal	
		2- <i>trans</i> -Nonenal	30	2- <i>cis</i> -5- <i>cis</i> -	20
		2- <i>cis</i> -Decenal	20	Octadienal	

Continuación **Tabla 3**

Ácido linoleico	(µg/g)	Ácido linolénico	(µg/g)
2- <i>trans</i> -4- <i>trans</i> - Nonadienal	30	3,5-Octadien-2- ona	30
2- <i>trans</i> -4- <i>cis</i> -Decadienal	250	2- <i>trans</i> -6- <i>cis</i> - Nonadienal	10
2- <i>trans</i> -4- <i>trans</i> - Decadienal	250	2,4,7-Decatrienal	85
<i>trans</i> -4,5-Epoxy-2- <i>trans</i> - decenal	150	1,5- <i>cis</i> -Octadien- 3-ona	^b

^a 1 g de ácido graso es oxidado a 20°C, por 0.5 mol de oxígeno/mol de ácido graso

^b Detectado, pero no cuantificado

1.3.3 Consecuencias de la peroxidación lipídica. Los productos primarios de la PL son inodoros y sin sabor. Así que la calidad de los productos alimenticios no se ve afectada por su generación. Sin embargo, los productos secundarios volátiles generados a partir de éstos, con frecuencia tienen olores y sabores desagradables (*off-flavour*) [3]. La aparición del *off-flavour* hace inapetecibles los alimentos al consumidor. Algunos compuestos carbonílicos formados sólo necesitan estar en concentraciones muy bajas, mg/kg o µg/kg, para dar la sensación de mal olor. Estos productos se generan principalmente durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos. Los compuestos carbonílicos se han encontrado en aceites en concentraciones de 150 mg/kg y en la leche en 50 µg/L, lo que significa que menos del 0,00002 % de los ácidos grasos han sido degradados, y esto ha sido suficiente para que aparezca el mal olor [27].

Por otro lado, las temperaturas mayores de 200 °C alcanzadas en los procesos de fritura de los alimentos y los triglicéridos (aceites) (**Figura 8**) provocan una complicada serie de eventos, entre los cuales se destacan: evaporación, reacciones de

polimerización, hidrólisis, reacciones de Maillard; que en conjunto imparten las diferentes características organolépticas a los alimentos. La generación de especies reactivas de oxígeno catalizada por las altas temperaturas y la descomposición de hidroperóxidos por los iones de metales de transición (para formar radicales peroxi y alcoxi) inducen la PL, la cual juega un papel importante en la transformación de los lípidos y la formación de compuestos potencialmente tóxicos para la salud [3].

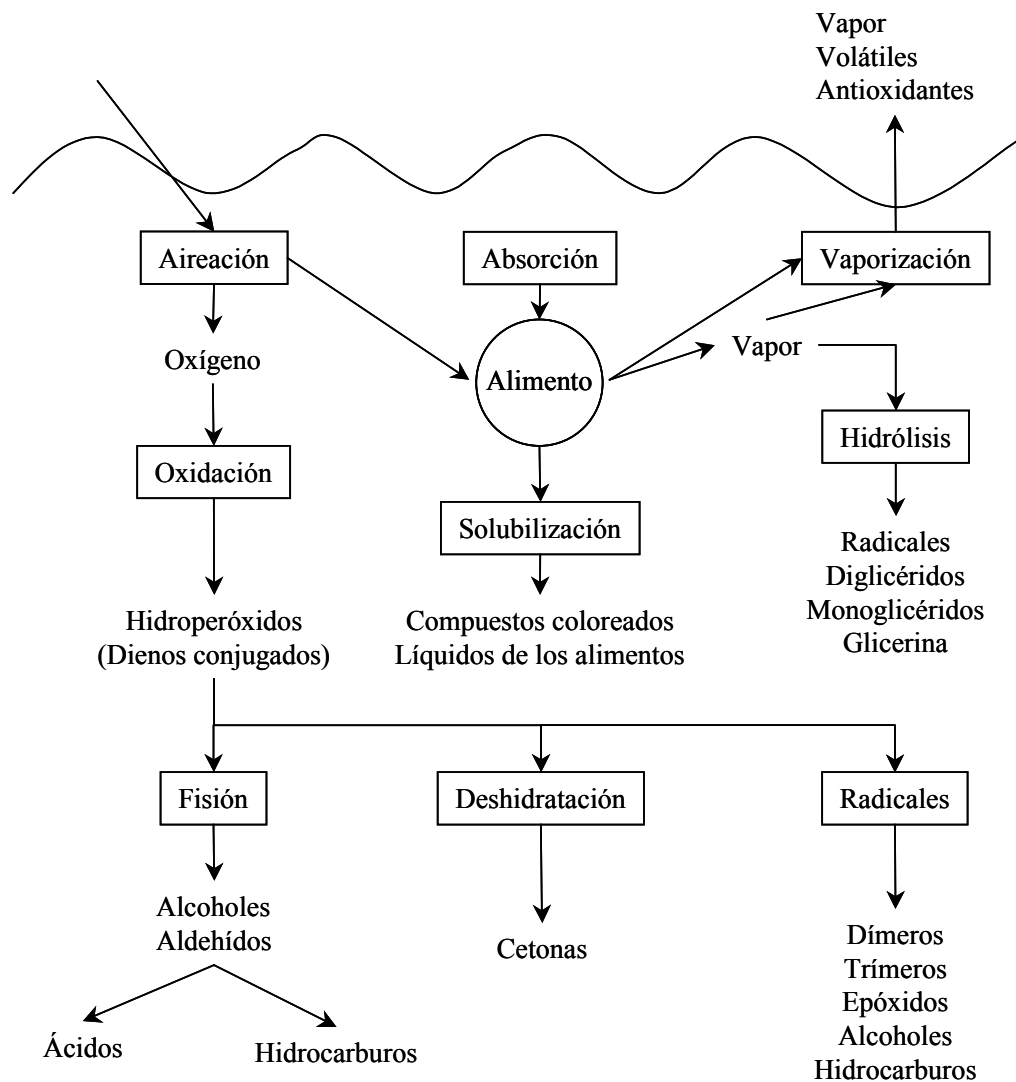


Figura 8. Cambios en los lípidos durante el proceso de fritura [3].

El “sabor a recalentado” en los productos cárnicos está relacionada con la presencia de compuestos carbonílicos. Cuanto mayor es la insaturación de los ácidos grasos en el tejido muscular, mayor será la susceptibilidad de éste al deterioro oxidativo. En general, el cerdo y las aves de corral contienen más lípidos poliinsaturados que las carnes de los rumiantes; por ende, son más propensos a sufrir PL y a degradarse en tiempos muy cortos [31].

La radiación es otro factor que está relacionado con los procesos degenerativos de las macromoléculas. Por ejemplo, los rayos UV son lo suficientemente energéticos para romper los enlaces de los hidrógenos más susceptibles en los ácidos grasos poliinsaturados e iniciar la reacción de PL y producir el deterioro oxidativo en los productos alimenticios y los tejidos [3,32].

Por otra parte, los radicales lipídicos generados pueden entrecruzarse entre sí o con las proteínas, alterando así las funciones normales de la membrana celular, provocando la necrosis y la posterior muerte de la célula [33].

Los daños en los alimentos y en los sistemas biológicos están fuertemente relacionados. El deterioro degradativo en los alimentos, que se consumen a diario, puede generar compuestos citotóxicos que ingresan al organismo humano y sumados a los compuestos endógenos, provocar reacciones que inducen la formación de especies radicalarias aún más reactivas, relacionadas con más de 50 enfermedades [2]. Los α -hidroxialdehídos son especies generadas durante la PL y son muy estudiadas por su alta actividad biológica [34,35]. Fung–Lung y colaboradores [36] estudiaron la reacción de epoxidación de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HN), un aldehído endógeno insaturado formado durante la PL, conducente al respectivo 2,3-epoxi-4-hidroxinonenal. Se ha encontrado, que el 4-HN es citotóxico en concentraciones altas, causa daños al hígado y riñón de las ratas; en cultivos de células produce aberraciones cromosomales y es mutagénico [36]. Los investigadores suponen que el

epóxido se puede formar por oxidantes biológicos y puede ser lo suficientemente estable para transportarse a través de la célula y, eventualmente, reaccionar con el ADN.

1.4 CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Se sabe, que la PL se inicia y acelera por los radicales, radiación, calor y la presencia de iones de metales de transición, como los del hierro y del cobre. Conociendo ésto, se puede disponer de varias estrategias para controlarla. Una de ellas es la protección del producto contra el oxígeno, en la cual se emplea el desplazamiento del aire remanente en el espacio de cabeza del recipiente con nitrógeno y el sellado del producto en empaques que son impermeables al gas [31]. Otra forma, es la adición de polímeros, tales como el poli(dimetilsiloxano) a los productos. Al parecer, el aditivo agregado actúa como una barrera protectora al paso del aire. Éstas son sólo algunas formas de prevención. Permiten detener la reacción de degradación oxidativa que causa la generación de los productos no deseados. Sin embargo, se necesitan agentes de regulación (antioxidantes) de las reacciones de oxidación antes, durante y después de iniciadas dentro del sistema blanco de deterioro.

1.4.1 Antioxidantes. Según Gutteridge [4], un antioxidante se define como una sustancia, que retarda o inhibe daño oxidativo a una molécula dada. Según Halliwell [29], antioxidante es toda sustancia que hallándose en bajas concentraciones con respecto a la de un sustrato oxidable, retarda o previene su oxidación. En las dos definiciones se entiende que el rol del antioxidante es prevenir o detener las reacciones de deterioro del material lipídico, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas presentes en células, alimentos y otras matrices, los cuales, fácilmente se oxidan.

Un antioxidante debe ser una molécula con características especiales. Debe poseer

una o varias de las siguientes propiedades: ser reductor, poseer electrones fáciles de donar, para estabilizar o “secuestrar” especies reactivas del oxígeno, formar complejos estables con los iones de metales de transición y reparar o reemplazar las moléculas blanco de PL, como el ADN [4]. De acuerdo con esto, se ha hecho una clasificación de los antioxidantes con base en los mecanismos de su acción y fuente de obtención.

1.4.2 Clasificación de los antioxidantes

1.4.2.1 Modo de acción

1.4.2.1.1 **Antioxidantes preventivos.** Son compuestos que evitan la iniciación de la reacción de peroxidación. Su mecanismo de acción incluye quelar los iones metálicos, atrapar el oxígeno o sus especies radicalarias, descomponer los hidroperóxidos en productos no radicalarios más estables, absorber la radiación UV o desactivar el oxígeno singulete [27].

Entre los atrapadores de ERO's figuran los β -carotenos, los cuales desactivan el oxígeno singulete; quelantes de metales, tales como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico, derivados de ácido fosfórico [31] y otros atrapadores de oxígeno. En el cuerpo humano existe una gran variedad de enzimas (metaloproteínas) y mecanismos de transporte de electrones, que pueden generar iones radical-superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que dañan las membranas lipídicas. Sin embargo, existen otras enzimas (e.g. superóxido dismutasa, SOD) que detienen la acción de iones radicales [2].

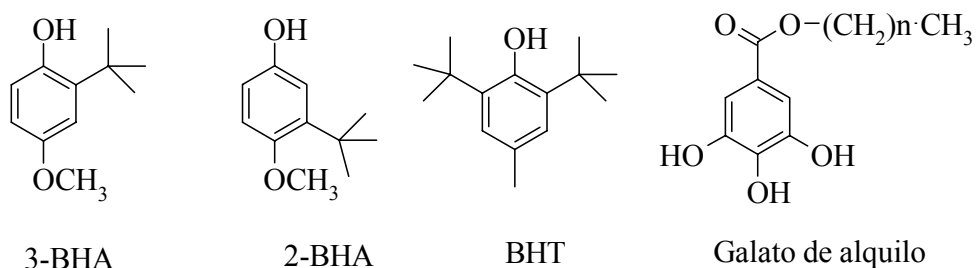
1.4.2.1.2 **Antioxidantes tipo scavengers.** Este tipo de antioxidantes actúa sobre los radicales reactivos ya formados, después de haber iniciado la reacción de PL, donándoles un hidrógeno o un electrón para convertir las especies radicalarias

reactantes en especies estables, es decir, producen un bloqueo o una interrupción de la reacción en cadena.

El radical del antioxidante, que se forma, debe ser lo bastante estable y poseer la capacidad de formar dímeros o reordenar su estructura para permitir la reacción con un radical alcoxi o peroxi, deteniendo así la reacción de oxidación del sustrato. Ejemplos de antioxidantes de este tipo son la vitamina E, los galatos y los flavanoides [27].

1.4.2.2 Fuente

1.4.2.2.1 **Antioxidantes sintéticos.** La utilización de los antioxidantes data de varios siglos. Sin embargo, a partir de los años 40 del siglo pasado se inició el uso de antioxidantes sintéticos, por poseer éstos una alta efectividad. Su solubilidad en las emulsiones es más alta, se concentran más cerca de la fase lipídica en las micelas, donde se lleva a cabo la oxidación y se pueden adicionar en pequeñas cantidades [5]. En la actualidad, los antioxidantes sintéticos más usados son 2-*ter*-butil-4-metoxifenol (BHA), el 2,6-di-*ter*-butil-*p*-hidroxitolueno (BHT), el *ter*-butil hidroquinina (TBHQ) y los galatos de alquilo. Algunas estructuras se muestran en la **Figura 9**.



Galatos de alquilo: n = 2, propilo; n = 7, octilo; n = 11, dodecilo.

Figura 9. Antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimenticia.

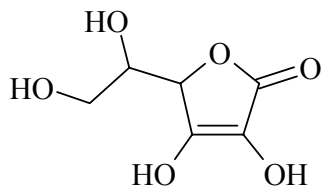
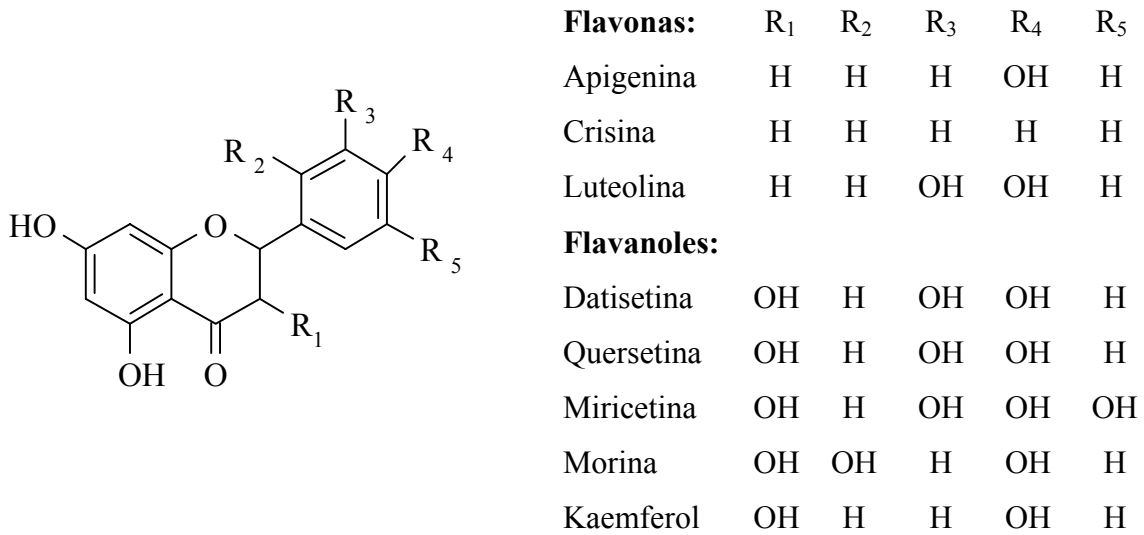
El problema que se presenta con los antioxidantes sintéticos está relacionado con su toxicidad. Por ejemplo, el BHA, el BHT y el galato de propilo (PG) tienen un DL₅₀ (dosis letal media) en ratas de 2.2, 1.04 y 3.6-3.8 g/kg, respectivamente. Además, el uso de estos aditivos como conservantes induce al cambio en las propiedades organolépticas de los productos alimenticios, por lo que se ha hecho un esfuerzo para encontrar antioxidantes de fuentes naturales. Sin embargo, el uso de estos antioxidantes está limitado a 100-200 mg/kg para el BHA, BHT o TBHQ y a 200-500 mg/kg para los galatos [7].

1.4.2.2.2 Antioxidantes naturales. El uso de antioxidantes naturales se ha extendido significativamente en los últimos años. Se ha encontrado que los compuestos fenólicos son las sustancias con mayor AA *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*, las cuales provienen de muchas fuentes, entre las que se encuentran y se han estudiado bebidas comunes (cerveza, jugos de naranja, limón y lima, entre otros) [6], té [6,37], vinos [38], aceites esenciales [40,41], extractos naturales y extractos crudos de plantas [42].

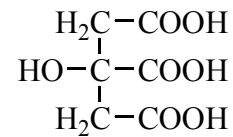
Los antioxidantes también se encuentran en forma endógena actuando en los seres vivos como parte natural del sistema de defensa, en forma de enzimas, dismutasa, peroxidasa, glutatión (GSH), vitaminas E y C, β -carotenos, flavanoides y compuestos de selenio (**Figura 10**).

El compuesto natural con mayor actividad antioxidante reconocido hasta ahora es el α -tocoferol o la vitamina E [4,43–45], que se encuentra dentro de los principales antioxidantes usados en alimentos. El cuerpo humano posee vitamina E como sistema de defensa en las membranas celulares dentro de la estructura hidrofóbica. La vitamina E contiene un grupo OH cuyo hidrógeno se extrae fácilmente. En el proceso de PL los radicales peroxi o alcoxi “prefieren” combinarse con el antioxidante en vez de atacar el ácido graso adyacente, terminando así la reacción en cadena; de ahí estas sustancias ganaron el nombre de “*chain-breaking antioxidants*”.

La reacción convierte el α -tocoferol en una especie radicalaria (α -toc \cdot), la cual es relativamente estable y no ataca los ácidos grasos (**Figura 11**).



Ácido ascórbico
Vitamina C



Ácido cítrico

Tocoferoles:	R ₁	R ₂	R ₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

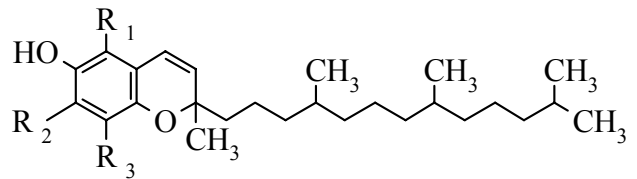


Figura 10. Antioxidantes naturales más conocidos.

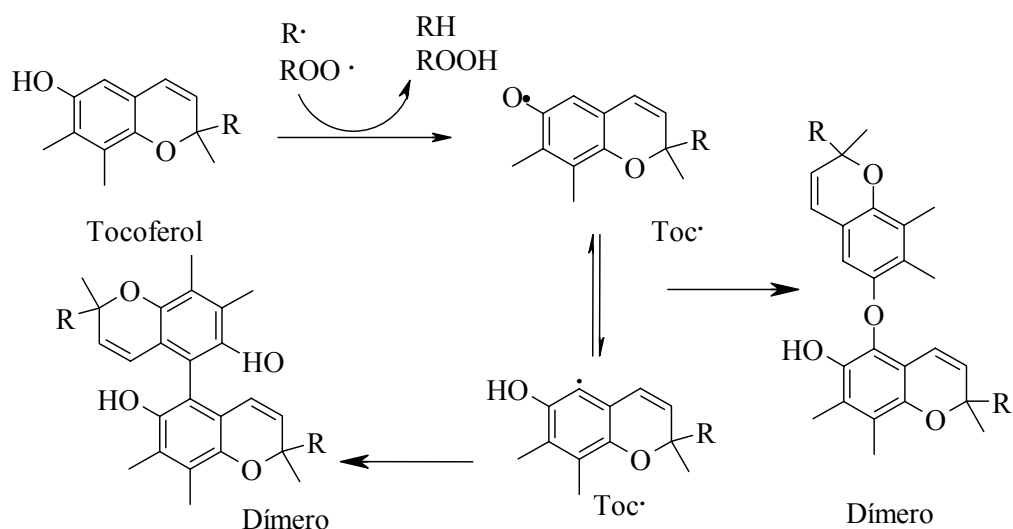
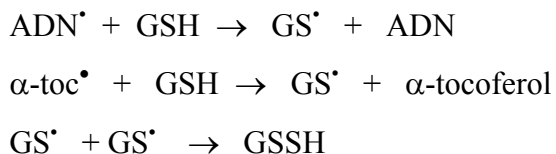


Figura 11. Algunas reacciones involucradas en la actividad antioxidante de los antioxidantes primarios, e.g. γ -tocoferol.

í

Estudios han demostrado que el α -toc· puede migrar por la superficie de la membrana y reaccionar con el ácido ascórbico para su recuperación y conversión al α -tocoferol, las dos sustancias parecen minimizar los procesos de PL en las membranas. La regeneración del α -tocoferol se hace por compuestos con grupos tiol (-SH) en su estructura, como el GSH [29]. Se supone, que el GSH también protege el ADN del daño producido por los radicales (**Esquema 7**).



Esquema 7. Reacciones llevadas a cabo por GSH durante la protección del ADN y la regeneración de α -tocoferol.

1.4.3 Antioxidantes en polímeros. La estabilización de polímeros y sus aditivos, durante el procesamiento a altas temperaturas, es muy importante en la industria polimérica [27].

El mecanismo de oxidación en los polímeros consta de los mismos pasos que en la peroxidación de lípidos; la diferencia radica en el tamaño de los productos primarios y secundarios formados en la reacción. Al-Malaica y colaboradores [46] estudiaron los efectos de la adición de α -tocoferol para estabilizar poli(propileno) en el proceso de extrucción a alta temperatura, así como el color del mismo, y compararon su acción con los aditivos comunes, usados para tal fin. El antioxidante natural ofreció mayor protección al polímero a las condiciones estudiadas. Igualmente, se han hecho estudios sobre la acción de los antioxidantes en caucho [47], y la estabilización en la vulcanización acelerada del mismo [48].

La forma de aplicación de los antioxidantes se hace por adición directa, pero se presenta el inconveniente cuando las moléculas pequeñas de antioxidante migran fácilmente a través de las redes poliméricas, por lo cual se prefiere enlazar los polímeros químicamente a los antioxidantes [27].

1.5 SISTEMAS MODELO PARA MEDIR LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La actividad antioxidante de una sustancia o extracto se puede determinar en sistemas lipídicos modelo, que tratan de simular *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* o *in vivo* determinada situación de oxidación de lípidos en sistemas complejos. Los sustratos, los reactivos y el material lipídico son seleccionados de acuerdo con el objetivo del estudio. Cada ensayo mide algo diferente, y por lo tanto, cada uno ofrece información diferente sobre el proceso de oxidación, pero igualmente valiosa. En el caso de PL en los seres vivos, donde se busca la relación entre la PL y diferentes enfermedades, los sistemas utilizados generalmente son *in situ* o *in vivo*. En los primeros, se toman células en las

cuales se induce la PL y se observa el comportamiento de los antioxidantes en los mismos. En los sistemas *in vivo*, se observan los efectos sobre ratas o sobre humanos, midiendo los productos primarios o secundarios de la PL en los fluidos biológicos [49].

1.5.1 Sustratos lipídicos. A continuación, se mencionan algunos de los sistemas lipídicos más utilizados en la medición de la AA de diferentes moléculas o sustratos.

1.5.1.1 Almacenamiento al ambiente. Este método ofrece la ventaja de simular las situaciones reales de PL en los alimentos. El problema se presenta con el tiempo del ensayo, ya que se deben esperar periodos muy prolongados para obtener la oxidación del sustrato y los resultados esperados.

1.5.1.2 Métodos basados en secuestradores de radicales o “*radical-scavenging*”. Es uno de los métodos más usados para medir la AA. El modelo simula la habilidad de los antioxidantes para atrapar los radicales formados en los procesos de PL.

El método consiste en adicionar un radical sintético al sistema, y medir la concentración de antioxidante requerido para secuestrar el 50 % de radicales adicionados en un tiempo determinado [7]. Los radicales más comúnmente usados son el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) y 2,2-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) [39,40].

1.5.1.3 Oxidación lipídica catalizada por iones metálicos. En estos modelos se trata de simular las condiciones en las cuales los alimentos se encuentran en contacto con iones de metales de transición, los últimos son iniciadores y aceleradores de la PL.

El Fe^{2+} es el más utilizado para inducir la PL. Se aprovecha la ventaja del ion metálico para ceder un electrón y cambiar su estado de oxidación. El mecanismo se basa en una reacción tipo Fenton y en la formación de especies radicalarias activas (alcoxi y peroxi) a partir de la reacción del metal con los hidroperóxidos [2,7].

1.5.2 Monitoreo de los productos de la peroxidación lipídica: El monitoreo de la PL se lleva a cabo usando los productos primarios o secundarios de la PL, los cuales se llaman marcadores (**Figura 12**). El oxígeno, que está involucrado en el proceso de deterioro de los ácidos grasos, también sirve como medida del grado de oxidación de un sustrato.

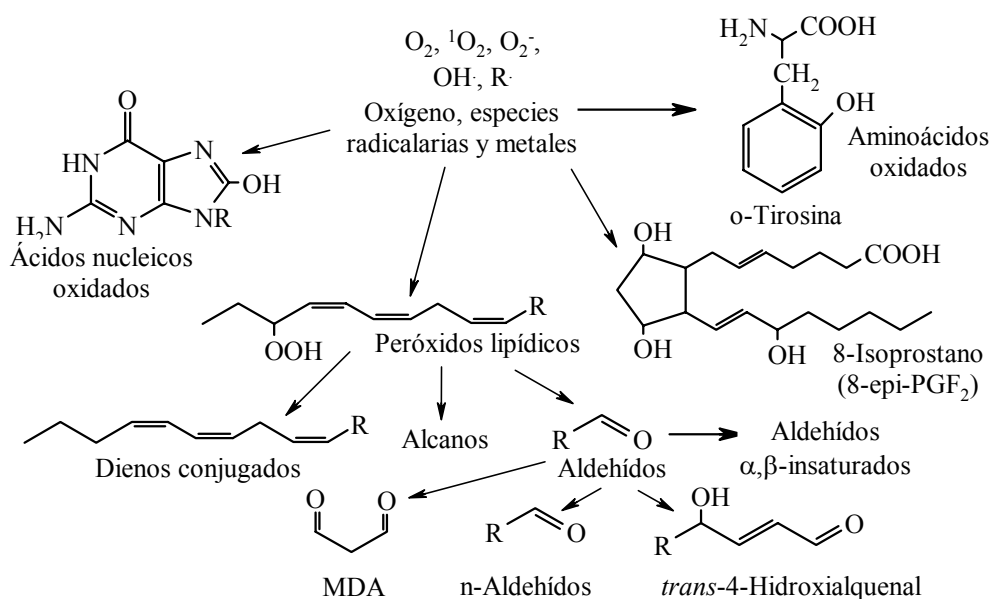


Figura 12. Productos derivados del daño causado por radicales libres. Principales marcadores para medir *in vitro* e *in vivo* el grado de peroxidación.

La escogencia de uno u otro marcador está determinada por el sistema que se esté estudiando; se prefieren marcadores que tengan alta especificidad para el efecto de interés, respuesta rápida a los efectos, análisis fácil y económico, con pocas

interferencias, una relación bastante cercana entre el efecto, la respuesta y el daño inducido [50]. Aunque no haya un marcador “ideal” con tales características, existen algunos que permiten estudiar los procesos de PL, *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, como los peróxidos, dienos conjugados, alcanos, aldehídos, derivados de ácidos nucleicos de ADN, aminoácidos oxidados y recientemente los 8-isoprostanos, los cuales se generan *in vivo* por la peroxidación del ácido araquidónico [49,50]. Estos marcadores se pueden medir por métodos sensoriales, en el caso de productos alimenticios, químicos o por métodos instrumentales (**Tabla 4**) [26,5].

Tabla 4. Métodos químicos e instrumentales más comunes para la determinación de la peroxidación lipídica.

<u>Métodos químicos:</u>	<u>Métodos sensoriales</u>
Valor de peróxido	Evaluación del <i>flavour</i>
Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)	<u>Oxígeno absorbido</u>
Valor de inicidina	Manómetro de Warburg
Valor de carbonilo	<u>Métodos cromatográficos</u>
Valor de ácido	HPLC, HRGC, HRGC-MSD/ECD/FPD/FID
<u>Métodos espectrofotométricos</u>	<i>Head-Space</i> y SPME
Absorción UV	Medición de derivados de PUFA's
Espectroscopía IR	Determinación de hidrocarburos derivados
Quimioluminiscencia	de aldehídos y cetónas volátiles

A continuación, se explicarán algunos de los métodos usados para monitorear la PL, los cuales combinan métodos químicos e instrumentales.

1.5.2.1 Prueba del ácido tiobarbitúrico. Es una de las pruebas más antiguas realizadas para medir el grado de peroxidación lipídica en alimentos, sistemas biológicos y lipídicos. Generalmente, en los procesos de PL, se forma

malondialdehído (MDA) libre. El MDA reacciona con el TBA para dar un compuesto coloreado que absorbe la radiación a 532 nm.

La siguiente es la reacción propuesta [2]:

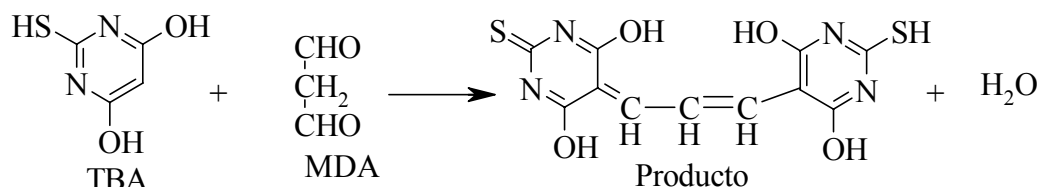
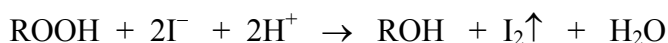
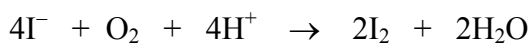


Figura 13. Reacción del TBA con el MDA.

1.5.2.2 Valor de peróxido. Es la determinación del contenido de hidroperóxidos y peróxidos. Es el método más económico que se usa para la determinación del grado de peroxidación en diferentes sistemas lipídicos. Se fundamenta en la formación de yodo (I₂) por los hidroperóxidos y peróxidos. El I₂ se titula y cuantifica con tiosulfato de sodio usando almidón como indicador. La formación de hidroperóxidos es:



El problema del método es que el oxígeno interfiere en la titulación, lo cual puede representarse de la siguiente manera:



Por esto, algunos investigadores han usado este método en forma automatizada y en ausencia de oxígeno. Los resultados se obtienen con alta sensibilidad y reproducibilidad, pero aún queda el problema de la complejidad y el costo del sistema empleado [51].

1.5.2.3 Medición de aldehídos y cetonas. Los compuestos de bajo peso molecular, productos finales de la PL, se usan preferiblemente para medir el grado de PL en los sistemas lipídicos. Se han utilizado la cromatografía de capa fina (TLC) y la líquida de alta eficiencia (HPLC) para la identificación de compuestos carbonílicos e hidrocarburos [52]. Actualmente, se usa la cromatografía gaseosa de alta resolución (HRGC) para la determinación y cuantificación de la CCV en los sistemas lipídicos. La medición de estos compuestos es un reto analítico porque, son muy volátiles, generan respuesta débil en detectores convencionales (TCD y FID) y su solubilidad en agua es alta, lo que hace obtener porcentajes de recuperación bajos con solventes orgánicos. La solución a este inconveniente es la derivatización de los compuestos carbonílicos y la detección de sus derivados con detectores altamente específicos. Generalmente, los CCV se hacen reaccionar con agentes derivatizantes, tales como 2,4-dinitrofenilhidracina [53] o PFPH [25,54], para formar las respectivas hidrazonas más estables y fáciles de cuantificar con detectores selectivos, e.g. de captura de electrones (ECD).

Una alternativa para analizar los compuestos carbonílicos volátiles, es el uso de la microextracción en fase sólida (SPME), técnica desarrollada por un grupo de investigadores dirigido por Pawliszyn, en la Universidad de Waterloo (Canadá) a finales de los años 80 [55].

El dispositivo para llevar a cabo SPME consta de una jeringa especial con una fibra de sílice fundida recubierta de un material polimérico [e.g. poli-(dimetilsiloxano)], la cual es expuesta a la fase vapor o sumergida en la fase condensada. Los analitos se extraen por adsorción y/o absorción (dependiendo del recubrimiento de la fibra), hasta llegar a un equilibrio de partición entre los analitos y la fase estacionaria. Los compuestos se analizan por desorción térmica en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases, o por dilución con solvente en un cromatógrafo con fase móvil líquida.

SPME es una técnica, que tiene grandes ventajas, puesto que permite hacer el análisis en un tiempo corto, con la mínima manipulación de la muestra y eliminando el uso de solventes [56,57]. Además, permite hacer extracción, concentración y si es necesario, derivatización en un mismo paso, lo cual hace más rápido y reproducible el análisis de compuestos carbonílicos volátiles, cuya medición permite apreciar el progreso de la peroxidación lipídica [25].

1.5.2.4 Pérdida de ácidos grasos. La PL implica la pérdida de los ácidos grasos. Por lo tanto, determinar su disminución está relacionado con el grado de PL en el sistema. El análisis de los ácidos grasos se puede hacer por HPLC, pero éstos también se pueden derivatizar a compuestos más volátiles y estables (ésteres), para analizarlos por HRGC [58,59]. Existen varias formas de derivatizar los ácidos grasos, pero la más utilizada es con trifluoruro de boro (BF₃) en metanol, seguida de la extracción con heptano o hexano y análisis por HRGC/FID [58].

1.6 *Coffea arabica* L.

El nombre común de *Coffea arabica* L. “café” se refiere a una de las bebidas más populares en el mundo. Es nativo de África (Etiopía). En el siglo XV se introdujo a Arabia, luego a Constantinopla y Venecia y se popularizó en Europa a la mitad del siglo XVII.

Sólo tres de las setenta especies de café se cultivan. La *Coffea arabica* L. es la que provee el 75 % de la producción mundial. Su introducción a nuestro país se llevó a cabo en el siglo XVIII. Al parecer, las primeras plantas se cultivaron en el Norte de Santander, cerca de lo que hoy se conoce como Cúcuta. Se sabe con certeza que de allí fue donde se empezó a exportar el preciado producto que más tarde sería el motor del desarrollo económico y social del país, puesto que se propagaron los cultivos de

forma rápida a escala nacional, especialmente, la región que se conoce como el Eje Cafetero.

Actualmente, existen aproximadamente 900 mil hectáreas cultivadas en café, 90 % de las cuales son predios menores de 5.0 hectáreas que se encuentran en poder de pequeños productores (350 mil familias), correspondiente a 4 millones de personas. Generan el 35 % del empleo total en el sector agrario. Esto significa para el país desarrollo rural, empleo, redistribución del ingreso y estabilidad en las zonas cafeteras [10,11]. El café es el segundo producto de exportación, después del petróleo. Provee gran parte de los ingresos de exportación para el país (**Tabla 5**) y, aunque su producción ha disminuido en los últimos años, el café colombiano sigue siendo el de mejor calidad en el mundo.

Tabla 5. Datos estadísticos de producción y exportación de café en Colombia durante 1996 y 2002 [10].

Año	Café verde ^a	Millones de dólares exportados	% Relativo de exportación total
1996	13.890	1.578	14,82
1997	10.704	2.261	19,58
1998	12.783	1.893	17,42
1999	7.340 ^c	1.347	11,6
2000	NR	1.069	8,15
2001	NR	764	6,22
2002 ^b	NR	174	6,34

^a Miles de sacos de 60 kilos. Incluye exportaciones y consumo interno.

^b Corresponde al periodo enero-marzo.

^c Corresponde al periodo enero-octubre.

NR: No reportado

El exquisito *flavour* del café se ha estudiado desde inicios del siglo pasado y se ha encontrado que se debe a una gran variedad de compuestos. Se han identificado más de mil sustancias, entre pirroles, furanos, tiofenos, fenoles, tiazoles, aldehídos, ácidos e hidrocarburos, entre otros [60]. Entre los de mayor peso molecular se encuentran proteínas, carbohidratos, lípidos, triglicéridos [3] y compuestos fenólicos, entre otros [62].

La cafeína (**Figura 14**), aunque no está relacionada directamente con el *flavour* del café, es muy importante por sus efectos fisiológicos. Es un estimulante del sistema nervioso central, causa insomnio, incrementa la actividad mental, es diurética, estimulante cardiaco y respiratorio [63]. Se encuentra de 0.8 al 3 % en las semillas, y casi en la misma concentración en las hojas.

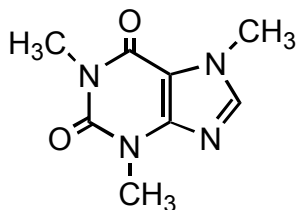


Figura 14. Estructura química de la cafeína.

1.7 *Erythroxylum coca* Lam.

El nombre común de la *Erythroxylum coca* Lam. es “coca”. Según los historiadores, su lugar de origen es el Perú, pero no sólo crece allí, también se encuentra en estado silvestre en Bolivia, Ecuador y Colombia. Ha sido muy empleada por los indígenas debido a sus propiedades medicinales de aumentar el bienestar corporal, lo cual la convierte en la “planta sagrada”. En la actualidad, los grupos indígenas remanentes en Colombia como los Guambianos y Paeces en el Cauca y Huila; Sionas en el Río Putumayo; Sálivas y Guahíbos en el Río Vichada; Puinabes, Carijonas, Barasanas,

Makunas, Yukunas, Huitotos, etc, en la Amazonía, aún la consumen en forma natural. Su empleo se remota a la época precolombina. Cuando los conquistadores llegaron a América notaron que los aborígenes la consumían cuando salían a cazar, hacían viajes largos o simplemente la “mambiaban”, aumentando así su resistencia física y mermando la sensación de hambre.

Preparar la hoja para el “mambeo” es todo un arte: las mujeres aborígenes recogían las hojas en canastos para posteriormente llevarlas a platos de barro o “pori” donde se secaban las hojas lentamente calentándolas a los rayos solares. Cuando se secaban las hojas, éstas se molían con maceradores de madera o “tataibi”, operación lenta que se realizaba durante toda la noche. El polvo se tamizaba muy finamente hasta obtener un residuo verde claro. Una pequeña porción del residuo (una cucharada) se echaba a la boca hasta humedecerla y formar una bola que se disolvía por completo en una hora aproximadamente.

La hoja de coca contiene como componente principal, un alcaloide llamado cocaína (Figura 15), junto con algunos alcaloides secundarios, glucósidos, proteínas, sales minerales y almidón, entre otros [63].

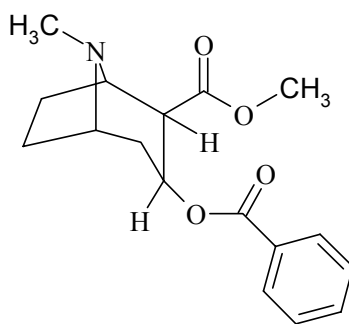


Figura 15. Estructura química de la cocaína.

La cocaína es un estimulante del sistema nervioso central, causante de la popularidad de la planta [64] y anestésico local [65]. Según Aranda y colaboradores [66], las características que motivan el uso reiterado del alcaloide, son la dependencia física y psicológica que éste produce. Esta dependencia se manifiesta por la aparición de la ansiedad al cesar el consumo del alcaloide, debido a los síntomas de depresión después de haber estado bajo los efectos placenteros del mismo.

Los síntomas que se presentan por el consumo de la cocaína son generalmente los siguientes: euforia, locuacidad, agitación, excitación y disminución de la sensación de fatiga. La sobredosis produce confusión, sed, convulsiones, aceleración del ritmo respiratorio e hipoxia (oxigenación insuficiente de los tejidos) agravada por insuficiencia cardio-circulatoria. La muerte puede darse por depresión respiratoria. La dosis mortal depende mucho de la resistencia que el cuerpo haya tomado a la droga, pero en promedio está alrededor de 1.4 g por vía oral o de 700 mg por vía parenteral o inhalado [67]. Con respecto al modo de administración, la cocaína se absorbe por cualquier vía: Ingresando, aspirada por la nariz, por vía oral, se inyecta o se fuma [68]. Se metaboliza a nivel hepático y se excreta por la orina en forma de metabolitos fáciles de detectar [69]. En el siglo pasado, el uso de la hoja de coca se extendió más allá de los rituales cotidianos de los indígenas, actualmente la cocaína pura de la planta se extrae para consumirla en cantidades grandes, en todas las esferas de la sociedad. Las causas del consumo envuelven circunstancias personales y sociales particulares, sin embargo, las incidencias del uso de la cocaína como droga varían de cultura a cultura y de grupo a grupo dentro de una misma cultura.

La Organización de Estados Americanos (OEA) y la Dirección Nacional de Estupefacientes [70,71] reportan la cantidad de cocaína incautada en Colombia a partir de 1995 (**Tabla 6**). La Defensoría del Pueblo en su libro “Los cultivos ilícitos, política mundial y realidad en Colombia” [9], reporta datos similares y algunos resúmenes estadísticos con respecto a la producción del alcaloide.

Tabla 6. Datos estadísticos sobre el decomiso de la cocaína, producida en Colombia, según la Dirección Nacional de Estupefacientes y la OEA.

Año	Colombia		
	Cocaína, kg	Hoja de coca, kg	Área cultivada ^a , Ha
1995	60410	394216	50900
1996	45779	686018	69200
1997	59459	212166	79100
1998	107480	340564	101800
1999	63946	307783	122500
2000	110552	NR	NR

NR: No reportado

^a Tomado de la referencia [9].

Los autores mencionan que para el procesamiento de una ha de hoja de coca al año, se requieren por lo menos 500 kg de cemento, 500 galones de gasolina y 12 L de ácido sulfúrico. Así, anualmente se requieren más de 200.000 toneladas de insumos para procesar las hojas de coca. Todos los desechos de estos insumos van a parar generalmente a las aguas (ríos, quebradas y riachuelos) cerca de los cultivos y a los suelos, donde después de erradicada la planta por fumigación o de forma manual, no se recupera pronto la fertilidad del terreno. En marzo de 2003 una cadena televisiva peruana reportó la muerte de 5 personas por ingerir aguas de un río contaminado por residuos de la producción de cocaína. La economía campesina de una región cocalera apartada de las zonas urbanas, se fundamenta principalmente en el comercio de la planta por lo que en estas regiones convergen una serie de problemas que hacen que los colonos tengan que huir por varias razones, donde intervienen los comerciantes o “narcolonizadores”, los pequeños y grandes cultivadores, los recolectores de hoja o “raspadores”, los trabajadores, los procesadores de las hojas, mujeres trabajadoras sexuales, la guerrilla, los paramilitares, las instituciones (iglesia, fuerzas armadas,

corporaciones financieras y sindicales) y las fumigaciones, las cuales arrasan con toda la biodiversidad del medio, incluyendo los cultivos de yuca, maíz, tomate, plátano, etc. Todo ello convierte estas regiones en lugares donde el más fuerte y el que tenga mayores recursos es quien sobrevive. Finalmente, cuando los cultivos ilícitos desaparecen, no queda nada, solo pobreza y los problemas sociales de los colonos que salieron y los que se quedaron [9].

En éste trabajo, se escogieron la *Erythroxylum coca* Lam. y *Coffea arabica* L, dos especies de mucha transcendencia para nuestro país. El cultivo de coca afecta de sobremanera la biodiversidad colombiana, y el café es un producto que nos identifica y que mueve la economía del país. Se evaluó la AA de extractos etanólicos de hoja de coca y grano de café tostado y molido, la cocaína y la cafeína por ser los compuestos principales presentes en las dos especies de plantas mencionadas, en concentraciones de 1, 5, 10 y 20 g/L. Los extractos se realizaron usando el sistema de extracción Soxhlet. La AA se determinó en un sistema lipídico modelo, basado en la oxidación del ALH por iones Fe^{2+} , en ausencia de luz y presencia de oxígeno.

La AA se midió usando HRGC para cuantificar el hexanal (principal producto secundario de la peroxidación del ALH). El hexanal se detectó, usando un microdetector de captura de electrones (μ -ECD) y se cuantificó en la fase condensada por extracción liquido-liquido (LLE) y, en la fase vapor por microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME). Igualmente, se determinó la actividad antioxidante, cuantificando la pérdida de ALH después del proceso de PL.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

2.1.1 Reactivos

Para la realización de este estudio se emplearon los siguientes reactivos:

Reactivos	Casa productora, pureza
Ácido linoleico	Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE.UU.), 97 %.
Sulfato de hierro heptahidratado	Merck (Darmstadt – Germany). Grado analítico.
Dodecil sulfato de sodio	Merck (Schuchardt, 85662 Hohenbrunn, Germany), > 99 %.
Trifluoruro de boro en metanol al 12 %	Merck (Schuchardt, 85662 Hohenbrunn, Germany).
BHT	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), 99%.
BHA	Merck (Hohenbrunn, Germany), > 98 %.
PFPH	Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE.UU.), 97 %.
Hexanal	Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, EE.UU.), 98 %.
FAME's	Supelco Inc. (Bellefonte, EE.UU.). Estándares.
Cafeína	Merck (Hohenbrunn, Germany), > 98 %.
Cocaína	Se suministró por el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (100 %, según análisis por HRGC/MSD, realizado en el Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL).
Solventes:	
Hexano	Mallinckrodt (Philisburg, NJ, EE.UU.), Grado HPLC
Metanol	Mallinckrodt (Philisburg, NJ, EE.UU.), Grado HPLC
Agua	Mallinckrodt (cPhilisburg, NJ, EE.UU.), Grado HPLC

2.1.2 Materiales

- ◆ Balones aforados de 2, 5, 10 y 25 mL \pm 0.3 mL (Vilab, Bogotá);
- ◆ Pipetas de émbolo de 25-250 y 100-1000 μ L (BRAND, Transferpette®, Postfach 1155. D-97864, Wertheim/Main, Germany);
- ◆ Tubos de ensayo de 16 x 150 mm (Vilab, Bogotá);
- ◆ Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL (BRAND, Postfach 1155. Wertheim, Germany);
- ◆ Roto-evaporador (Büchi, Switzerland);
- ◆ Frascos ámbar de 2 mL;
- ◆ Barra magnética (2 x 10 mm);
- ◆ Consumibles cromatográficos [septa, liner, gases (AGA Fano, Bucaramanga, Colombia), jeringas Hamilton de 10 μ L, férulas y frascos de 1.5 mL para solventes, entre otros].

2.1.3 Material vegetal

- ◆ Grano de café tostado y molido (Diamante, Bucaramanga): se adquirieron en el mercado local.
- ◆ Hoja de coca: se recolectaron en la huerta experimental del Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, UIS.

2.1.4 Equipos

- ◆ Balanza de precisión (Mettler Toledo AG285 \pm 0.00001 g, Switzerland);
- ◆ Balanza de precisión (BA310S Sartorius Basic \pm 0.005 g, Germany);
- ◆ *Minishaker* (IKA, JKMS, Hofheim/Ts Germany);
- ◆ Sistema de extracción Soxhlet;

- ◆ Sistema de extracción con fluido supercrítico, Extractor Soxhlet de alta presión (J & W Scientific, Folsom, EE.UU.);
- ◆ Fibras para microextracción en fase sólida [poli-(dimetilsiloxano)/divinilbenceno, 65 μm , Supelco Inc., EE.UU.];
- ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus*, con programación electrónica de presión, dotado con microdetector de captura de electrones ($\mu\text{-ECD}$, ^{63}Ni , 280°C), inyector automático HP 7683 *Series*, puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:10) y sistema de datos HP ChemStation HP Rev. A.06.03 [509]. Se empleó una columna HP-5, 30 m x 0.2 mm D.I. x 0.33 μm f.e., 5% fenil-poli(dimetilsiloxano). La programación de temperatura del horno fue de 100 °C por 5 min hasta 250 °C por 5 min @ 10 °C/min. Se utilizó helio (99.995 %), como gas de arrastre con una velocidad de 1 mL/min (70°C), y mezcla de argón-metano (9:1), como gas auxiliar;
- ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 5890 A *Series* II, equipado con detector de ionización en llama (FID, 250°C), puerto de inyección *split/splitless* (relación *split* 1:10, 250°C), sistema de datos HP GC ChemStation Rev. A. 05.05.[273], columna DB-WAX [poli(etilenglicol)] de 60 m x 0.25 mm D.I., x 0.25 μm f.e. La programación de temperatura del horno fue de 100 °C hasta 136 °C (1 min) @ 2 °C/min, luego hasta 250 °C (25 min) @ 7 °C/min. Volumen de inyección 2 μL , se usó helio (99.995 %) como gas de arrastre con una velocidad de 1 mL/min (70°C), la presión de entrada en la cabeza de la columna fue de 200 kPa, se emplearon aire e hidrógeno como gases de combustión, y nitrógeno, como gas *make-up*, a 300, 30 y 30 mL/min, respectivamente;
- ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, HP 5890A *Series* II acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972, sistema de ionización por impacto de

electrones (70 eV), analizador másico cuadrupolar, sistema de datos con dos bibliotecas de espectros de masas NBS75K (75.000 espectros) y WILEY 138 (138.000 espectros), equipado con un inyector automático HP 6890 *Series*, puerto de inyección *split/splitless* (relación *split* 1:30, 250°C), las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 180 y 285°C, respectivamente. Se usó una columna HP-5MS, 60 m x 0.25 mm D.I. x 0.33 µm f.e., 5% – fenil-poli(dimetilsiloxano), con la programación de temperatura de 100 °C por 5 min @ 2.5 °C/min hasta 280 °C por 10 min. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas se obtuvieron en un rango de masas *m/z* 40 – 450.

2.2 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para el tratamiento estadístico de los resultados se reportan el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (*s*) y el coeficiente de variación (CV), expresados según las **Ecuaciones 1–3**:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

\bar{X} = Valor promedio;

X_i = Valor obtenido para la variable medida;

n = Número de mediciones de una variable;

s = Desviación estándar;

CV = Coeficiente de variación (%).

2.3 DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DE LOS t_R Y LAS ÁREAS CROMATOGRÁFICAS

2.3.1 Hexanal. A la solución “*stock*” (1.0 mL) de hexanal (10 mg/L) en metanol, se le adicionó una solución (160 μ L) de PFPH en metanol (17 g/L). La mezcla se aforó a 2 mL con metanol, para obtener la concentración del hexanal de 5 mg/L. La mezcla se dejó en reacción por dos horas. Luego, una alícuota de esta solución (1 μ L) se inyectó al HRGC/ μ -ECD. Cada preparación se realizó por triplicado.

2.3.2 Ácidos grasos. Se preparó una solución en metanol de los siguientes ésteres de ácidos grasos: palmítico, esteárico, oléico, linoleico, linolénico y araquídico. Se inyectó 1 μ L por triplicado al HRGC/FID.

2.4 EXTRACCIÓN SOXHLET DE HOJA DE COCA Y GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO Y ANÁLISIS POR HRGC/MSD DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

2.4.1 Extracción Soxhlet y análisis por HRGC/MSD.

La extracción Soxhlet de hoja de coca y el grano de café tostado y molido, se realizó tomando hoja de coca molida (35 g), previamente secada en la estufa a 70°C durante 24 h, y el grano de café tostado y molido (35 g). Cada una de las muestras se colocó en el cuerpo del extractor Soxhlet, dentro de un dedo de papel celulosa (**Figura 16**). La extracción con etanol se llevó a cabo durante 24 horas. De los extractos obtenidos, se tomó una alícuota (1 mL), que se filtró utilizando papel filtro franja

negra, para retirar los residuos sólidos. 1 μL de cada filtrado se inyectó al HRGC/MSD. Los extractos restantes se rotoevaporaron a presión baja, hasta eliminar la mayor cantidad de solvente. Cada extracto viscoso se transfirió a un frasco de 10 mL con tapa. Las muestras se almacenaron en un lugar fresco y seco.



Figura 16. Equipo de extracción Soxhlet.

2.4.2 Análisis de ácidos grasos en los extractos evaporados de hoja de coca y grano de café tostado y molido.

Se analizó el contenido de ácidos grasos en los extractos evaporados de hoja de coca y grano de café tostado y molido. Se tomaron entre 40 y 60 mg del extracto, a los cuales se adicionaron 5 mL del complejo de trifluoruro de boro al 12 % en metanol. La mezcla se agitó magnéticamente, sumergida en un baño de aceite a 85-90°C durante 1 h. Luego, se dejó enfriar y se adicionó hexano (1 mL) para extraer los metil ésteres de ácidos grasos (FAME's). La mezcla se agitó (*Minisahker*) vigorosamente a 1800 rpm por 1 min, posteriormente, se tomó la fase orgánica superior (0.5 mL) y se

diluyó con hexano (1 mL). Esta solución (1 μ L) se inyectó en el HRGC/FID.

2.5 SFE DE HOJA DE COCA Y GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO Y ANÁLISIS POR HRGC/MSD DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

Para la extracción con fluido supercrítico (**Figura 17**) de las hojas molidas de coca y grano de café tostado y molido, se tomaron 10 g de cada muestra. Cada una de las muestras se colocó en el Soxhlet del equipo SFE, para su respectiva extracción durante dos horas usando como “solvente” CO₂ (310 g) en estado supercrítico (> 45 °C y \approx 1100 psi). El extracto final, libre de solvente, se diluyó con diclorometano (1 mL) y se inyectó (1 μ L) al HRGC/MSD.



Figura 17. Equipo de extracción con fluido supercrítico (SFE). Soxhlet de alta presión (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.).

2.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS EVAPORADOS DE HOJA DE COCA Y GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO, COCAÍNA, CAFEÍNA, VITAMINA E Y BHA, EN UN SISTEMA LIPÍDICO MODELO

2.6.1 Oxidación del ácido linoleico inducida por iones Fe^{2+}

2.6.1.1 **Blanco.** El blanco del experimento consistió en la oxidación del ALH en un sistema lipídico modelo, sin la adición de una sustancia antioxidante. En un tubo de ensayo se colocó la solución (2.0 mL) de ALH (2.5 g/L), preparada en buffer [trizma 0.25 mM, KCl 0.75 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 g/L, pH 7.4], se adicionó una solución acuosa (0.5 mL) de sulfato de hierro (0.56 g/L). La mezcla se aforó con la buffer de trizma (**Solución A**) a 5 mL y se tapó muy bien para evitar la pérdida de compuestos carbonílicos volátiles generados durante la oxidación del ALH.

2.6.1.2 **Actividad antioxidante de la vitamina E, el BHA, los extractos evaporados, la cocaína y la cafeína.** Para evaluar el efecto protector contra la oxidación del ALH de las sustancias mencionadas en el sistema lipídico modelo, éstas se adicionaron al buffer de trizma en concentraciones de 1, 5, 10 y 20 g/L. Para ésto, se prepararon soluciones blanco o **Solución A**, así: se colocó la solución (2.0 mL) de ALH (2.5 g/L) preparada en una buffer de trizma, se adicionó una solución acuosa (0.5 mL) de sulfato de hierro (0.56 g/L), se adicionaron soluciones de las sustancias con posible actividad antioxidante, tal como se muestra en la **Tabla 7**, y, finalmente, las mezclas se aforaron con buffer de trizma a 5 mL.

Tabla 7. Volúmenes usados para la preparación de las soluciones en la evaluación de la AA de la vitamina E, el BHA, los extractos evaporados de hoja de coca y grano de café tostado y molido, la cocaína y la cafeína.

Concentración, g/L*	Ácido linoleico (2.5 g/L), mL	Sulfato de hierro (0.56 g/L), mL	Antioxidante (100 g/L), mL	Buffer de trizma, mL
Blanco	2.0	0.50	0.00	2.50
1.0	2.0	0.50	0.05	2.45
5.0	2.0	0.50	0.25	2.25
10	2.0	0.50	0.50	2.00
20	2.0	0.50	1.00	1.50

* Volumen final de 5 mL

Tanto la solución utilizada como blanco y las soluciones que contenían el antioxidante se colocaron en incubación en un baño termostático por 12 ± 0.1 h, a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, en ausencia de luz y en la presencia del oxígeno remanente en el espacio de cabeza del tubo de ensayo. Transcurrido el período de incubación, las mezclas se retiraron del baño, se les adicionó BHT en metanol (100 μL , 20 g/L) y, por último, las mezclas se colocaron en refrigeración (2°C), para la posterior extracción del hexanal o la cuantificación del ALH, que no sufrió el proceso degradativo.

2.6.2 Derivatización-extracción del hexanal. La cuantificación de los productos secundarios finales de la PL, es la forma directa de determinar el grado de peroxidación del sistema y el método indirecto de medir la AA. El hexanal (como derivado hidrazónico), se cuantificó según la metodología descrita en trabajos previos realizados en el Laboratorio de Cromatografía (CIBIMOL) por Stashenko y colaboradores [22–25]. Su determinación se realizó en el sistema lipídico, tanto en la fase condensada, es decir, la solución de ALH, por LLE [19,20], como directamente por HS-SPME en la fase vapor [24].

2.6.2.1 Derivatización del hexanal seguida de la extracción líquido-líquido en la fase condensada. A la solución (5 mL) de ALH oxidado, proveniente de los procedimientos descritos en las Secciones 2.6.1.1 y 2.6.1.2, se le adicionó la solución de PFPH en hexano (400 μ L, 6.8 g/L). La mezcla se agitó durante 1 min a 1800 rpm y, posteriormente, se centrifugó por un lapso de 2 min, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. En algunos casos, se observó la formación de emulsión y para romperla se adicionó cloruro de sodio (0.5 g). Luego, se tomó la fase orgánica (superior) (0.5 mL) y se llevó a 1 mL con hexano. Las soluciones se dejaron en reacción por 2 horas. Cada solución (1 μ L) se inyectó luego al HRGC/ μ -ECD, para su análisis cromatográfico.

2.6.2.2 Derivación del hexanal sobre la fibra y extracción simultánea por HS-SPME. Este procedimiento se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Stashenko y colaboradores [25]. Primero, se saturó la fibra [65 μ m, poli-(dimetilsiloxano)/divinilbenceno, PDMS/DVB] (**Figura 18**) con agente derivatizante, PFPH, exponiéndola a los vapores de una solución acuosa (2 mL) 0.1 mM de PFPH, durante 60 min a temperatura ambiente (25°C) y con agitación (500 rpm). De inmediato, la fibra saturada se colocó por 30 min a la misma temperatura, en el espacio de cabeza de una alícuota (0.5 mL) de la matriz lipídica sometida a peroxidación, obtenida según los procedimientos descritos en las Secciones 2.6.1.1 y 2.6.1.2. Una vez derivados los compuestos carbonílicos sobre la fibra, se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección del HRGC/ μ -ECD durante 5 min a 250 °C.



Figura 18. Equipo de microextracción en fase sólida (SPME).

Los efectos protectores de la vitamina E, el BHA, los extractos de hoja de coca y grano de café tostado y molido, la cafeína y la cocaína, se determinaron mediante la **Ecuación 4**, usando el valor del área de pico del hexanal, en el cromatograma de compuestos carbonílicos volátiles derivatizados con PFPH sobre la fibra:

$$\text{Efecto protector} = \frac{a-b}{a} \times 100\% \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

- a – Área del hexanal medida en el sistema sometido a peroxidación sin antioxidante (blanco);
- b – Área del hexanal medida en el sistema sometido a peroxidación en la presencia de antioxidante.

2.6.3 Determinación del ácido linoleico en el sistema sometido a peroxidación.

La determinación de los ácidos grasos remanentes después de la PL, permite, al igual que la determinación del hexanal, relacionar su cantidad con el grado de peroxidación y así evaluar el efecto protector antioxidante de sustancias adicionadas al sistema. El ALH se midió en forma de su metiléster antes y después de la PL, en ausencia y en presencia de la vitamina E, el BHA, los extractos evaporados de hoja de coca, grano de café tostado y molido, la cafeína y la cocaína.

En un tubo de ensayo se tomó la solución (1 mL) sometida a peroxidación así como se describe en los procedimientos de las Secciones 2.6.1.1 o 2.6.1.2, y se le adicionó complejo de trifluoruro de boro (5 mL) al 12 % en metanol. El tubo se selló bien, para evitar las pérdidas. La mezcla, mientras se sometía con agitación magnética, se sumergió a un baño de aceite a 85–90°C durante 1 h. Se dejó enfriar y se adicionó hexano (1 mL) para extraer los metilésteres de ácidos grasos (FAME's). La mezcla se agitó (*Minisahker*) vigorosamente a 1800 rpm por 1 min, se dejó reposar. Se tomó la fase orgánica superior (0.5 mL) y se llevó a 1 mL con hexano. La solución obtenida (1 µL) se inyectó al HRGC/FID.

Los efectos protectores de la vitamina E, el BHA, los extractos evaporados de hoja de coca, grano de café tostado y molido, la cafeína y la cocaína se midieron (**Ecuación 5**) con base en la disminución del área cromatográfica de ALH causada por su pérdida o alteración química durante el proceso de oxidación, así:

$$\text{Efecto protector} = \frac{(b - a)}{(c - a)} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

- a* – Área del ALH medida en el sistema sometido a peroxidación sin antioxidante (blanco)
- b* – Área del ALH medida en el sistema sometido a peroxidación en la presencia del antioxidante.
- c* – Área de ALH medida al inicio de la reacción de peroxidación.

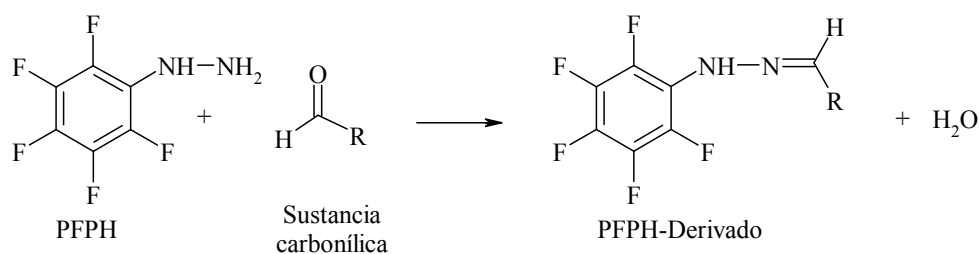
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la última década, el estudio de la actividad antioxidante de frutas, vegetales y extractos crudos de plantas [42] es uno de los temas que ha despertado mucho interés de los investigadores. Las plantas contienen una gran cantidad de compuestos con actividad biológica, de donde se puede aprovechar su potencial en diferentes ramas de la industria y la medicina [74]. La búsqueda de compuestos naturales con actividad antioxidante interesa en gran parte a la industria de los alimentos. Los antioxidantes naturales pueden cumplir con varias funciones al mismo tiempo, a saber: como preservantes, aromatizantes, saborizantes y nutrientes). En la medicina la utilización de compuestos con actividad antioxidante permitiría el desarrollo de nuevos fármacos para la prevención de enfermedades relacionadas con el “estrés oxidativo”, tales como el cáncer, el asma y los asociados con problemas cardiovasculares. En la industria de los polímeros, los nuevos aditivos naturales ayudarían a mejorar la calidad de los productos.

Muchos sistemas lipídicos han sido diseñados para simular *in vitro* los diferentes procesos oxidativos de las proteínas, las bases nitrogenadas del ADN y los ácidos grasos, en alimentos y tejidos celulares. Debido a que los procesos de PL *in vivo* son más difícil de estudiar, es necesario empezar con modelos lipídicos más sencillos [72], en los cuales se puede obtener información valiosa que sirve como soporte para investigaciones en sistemas más complejos. En el presente trabajo, se usó el ALH como sistema lipídico modelo. La oxidación se indujo por iones de hierro (Fe^{2+}) en solución amortiguadora de trizma a pH 7.4 en ausencia de luz y en presencia de oxígeno.

Este modelo pretende “simular”, en parte, a los ácidos grasos que se encuentran en los productos con alto contenido lipídico, y durante su procesamiento y almacenamiento se exponen a la oxidación en presencia de oxígeno e iones de metales de transición. Por ejemplo, en los productos cárnicos los iones Fe^{2+} son proporcionados por la hemoglobina, la mioglobina y varias enzimas que dentro de su estructura poseen un átomo de hierro.

Para evaluar el avance del proceso de PL, se usaron dos marcadores, a saber: el ALH y el hexanal. Se midió por cromatografía de gases de alta resolución tanto la generación de hexanal durante el deterioro del ALH, como la pérdida de ALH, que fue cuantificado en forma de su metiléster. La extracción del compuesto carbonílico se realizó por dos técnicas analíticas diferentes: extracción con hexano (LLE) para la fase condensada, y HS-SPME para la fase vapor. Ésta última es una técnica de análisis recientemente propuesta, que tiene varias ventajas analíticas sobre la extracción con solventes, para cuantificar compuestos volátiles y semivolátiles. La medición de la pérdida de ALH permitió determinar en forma directa el deterioro del material lipídico. Se ha encontrado que los compuestos carbonílicos son los mejores marcadores para medir el grado de peroxidación en modelos donde las temperaturas no han sobrepasado los 50°C. Sin embargo, la alta solubilidad de estos compuestos en agua, su volatilidad y baja respuesta producida por detectores convencionales como el FID, hacen difícil su análisis directo. El diseño metodológico, seguido por Stashenko y colaboradores [23,25], aprovechó la reactividad de los aldehídos en reacciones con las hidracinas, para formar hidrazonas (**Figura 19**), las cuales son menos volátiles, solubles en solventes orgánicos y más estables. El agente derivante, PFPH, posee en su estructura 5 átomos de flúor, que hace la respuesta muy sensible en el detector específico ECD, donde se logra un nivel mínimo de detección de hasta femtomoles [25].



R – Radicales alquilo

Figura 19. Reacción de los aldehídos con las hidracinas y formación de hidrazonas.

3.1 DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD DE LOS t_R Y LAS ÁREAS CROMATOGRÁFICAS

En la **Tabla 8** aparece el estudio de la repetibilidad de los tiempos de retención (t_R) y las áreas para el derivado PFPH–hexanal y los metilésteres de ácidos grasos. Los coeficientes de variación (CV) no superaron 0.03 % para los t_R y 0.3 % para las áreas de los picos.

3.2 SISTEMA LIPÍDICO MODELO: OXIDACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO INDUCIDA POR IONES Fe^{2+} EN BUFFER DE TRIZMA

La explicación del comportamiento del sistema lipídico de ALH usado en el presente trabajo, se apoyó sobre lo reportado por Bondet y colaboradores [73], quienes estudiaron la PL del ALH, inducida por la acción del Fe^{2+} /ácido ascórbico a 30°C en presencia de oxígeno. Se midieron dienos conjugados. Los autores determinaron que pequeñas cantidades de peróxidos presentes en la etapa inicial de la incubación eran necesarias para iniciar la reacción de peroxidación, con la formación de radicales RO^\bullet , por reacción con el Fe^{2+} .

Tabla 8. Estudio de la repetibilidad en los t_R y las áreas cromatográficas del hexanal y de algunos ácido grasos.

Compuesto	t_R, min			\bar{X}	s	CV, %
Hexanal	13,858	13,860	13,859	13,859	0,0010	0,007
Ácido palmítico	38,745	38,734	38,732	38,737	0,0070	0,018
Ácido esteárico	42,094	42,077	42,071	42,08	0,011	0,028
Ácido oleico	42,433	42,429	42,427	42,430	0,0031	0,007
Ácido linoleico	43,210	43,206	43,194	43,203	0,0083	0,019
Ácido linolénico	44,333	44,324	44,320	44,326	0,0067	0,015
Ácido araquídico	45,654	45,648	45,645	45,649	0,0046	0,010
Área, cuentas						
Hexanal	458899	457592	459758	4,59E+05	1.1E+03	0.24
Ácido palmítico	23346	23254	23312	2,33E+04	4,6E+01	0,20
Ácido esteárico	23884	23901	23836	2,39E+04	3,4E+01	0,14
Ácido oleico	26033	26089	26001	2,60E+04	4,4E+01	0,17
Ácido linoleico	11368	11405	11365	1,14E+04	2,2E+01	0,20
Ácido linolénico	9966	9979	9954	9,97E+03	1,3E+01	0,13
Ácido araquídico	11489	11495	11475	1,15E+04	1,0E+01	0,09

Los RO^\bullet reaccionaron con los RH para dar los respectivos radicales R^\bullet . Se encontró también, que el Fe^{2+} con los ROOH reaccionaba en los primeros minutos para dar Fe^{3+} (que termodinámicamente no reacciona con ROOH) y después, la reacción se autosostuvo sin la ayuda de ningún iniciador. El oxígeno no fue un factor limitante de la reacción de propagación, pero sí lo fue el ALH que se oxidó completamente en 25 h aproximadamente.

Los datos presentados por Bondet y colaboradores para el sistema lipídico de ALH (oxidado con Fe^{2+} /ácido ascórbico) se relacionaron con los datos reportados por Salgar y Delgado [19,20] en el Laboratorio de Cromatografía (UIS) para el sistema de ALH (oxidado con Fe^{2+}). Salgar y Delgado cuantificaron el hexanal durante la reacción de peroxidación y encontraron que su formación aumentaba en un periodo de 24 h (**Figura 20A**), mientras que Bondet y colaboradores determinaron que hasta las 24 horas se formaban principalmente dienos conjugados y después de este tiempo, la descomposición de los mismos a productos secundarios, era más evidente (**Figura 20B**).

Salgar y Delgado encontraron también que la adición de peróxido de hidrógeno al sistema no afectaba de manera significativa la formación del hexanal en las primeras 24 h, lo que es evidente, si el mecanismo principal por el cual se inicia la reacción es la formación de RO^\bullet , con la participación de los iones Fe^{2+} . Ambos estudios apuntan a concluir que la etapa inicial de la reacción es inducida por el Fe^{2+} , seguida de la formación de dienos (y seguramente otros compuestos primarios de la PL) y, finalmente, la descomposición de éstos para generar los compuestos secundarios (aldehídos, cetonas e hidrocarburos de bajo peso molecular, e.g. pentano).

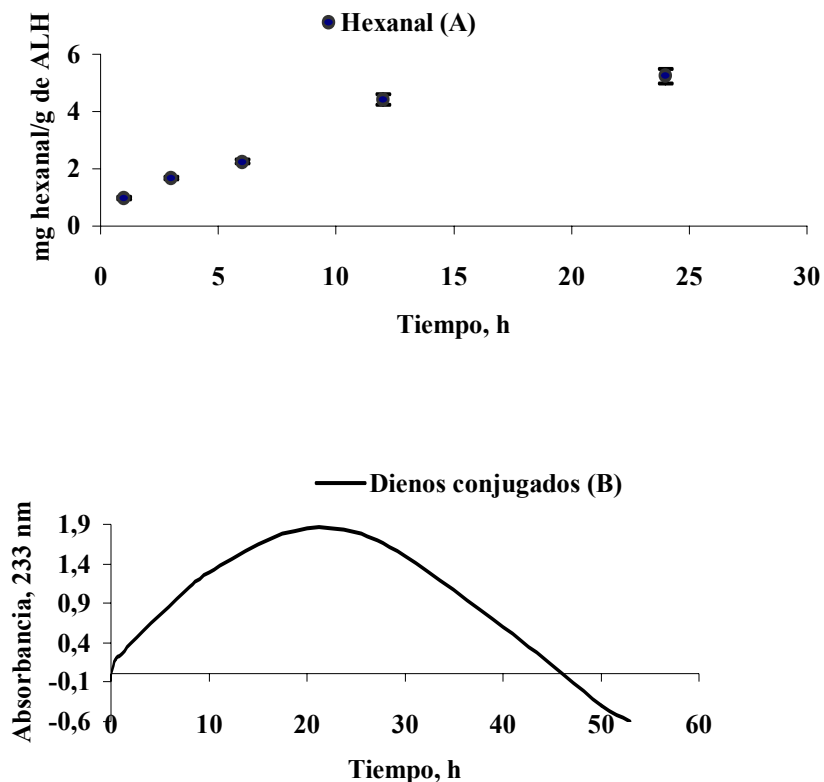


Figura 20. Estudio del proceso de peroxidación lipídica: **A.** Generación del hexanal inducida por la oxidación de ALH a pH 7.4, 37°C en presencia de Fe^{2+} [19,20] y **B.** Cinética de la producción de dienos conjugados durante la oxidación de ALH a pH 6.4, 30°C [73].

3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE COCA, GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO, CAFEÍNA, COCAÍNA VITAMINA E Y BHA

En el presente trabajo se estudió la capacidad de extractos naturales y compuestos naturales y sintéticos, de prevenir la oxidación del ALH, inducida por iones de Fe^{2+} , en presencia de oxígeno y ausencia de luz. Las sustancias examinadas fueron extractos etanólicos crudos de hoja de coca y de grano de café tostado y molido.

Además, se estudiaron los alcaloides, la cocaína y la cafeína. El sistema lipídico modelo de ALH se validó estudiando el comportamiento de dos antioxidantes de actividad reconocida [72], i.e. la vitamina E, de origen natural y el BHA, sustancia sintética.

Para evaluar la capacidad de las sustancias estudiadas para inhibir la oxidación del ácido linoleico, se comparó la cantidad del hexanal producido en el sistema lipídico, cuando se adicionaron las sustancias bajo estudio y la cantidad del hexanal en ausencia de éstas. El hexanal se aisló tanto de la fase condensada, por extracción líquido-líquido con una solución de PFPH en hexano (tal como se describió en la Sección 2.6.2.1), como de la fase vapor, por HS-SPME. Se aprovechó la volatilidad y la reactividad del aldehído para su derivación directamente sobre la fibra (*in situ*), previamente saturada con PFPH. Una vez derivado, el analito se desorbió en el puerto de inyección del cromatógrafo y el área bajo el pico se utilizó para su cuantificación. La cantidad de hexanal se relacionó con la AA según la **Ecuación 4** (Sección 2.6.2.2).

En ambos casos el hexanal se detectó con el ECD, en forma de su derivado hidrazónico. En la **Figura 21**, se muestra la disminución del hexanal causada por la adición del extracto de hoja de coca a la emulsión del ácido linoleico.

También se comparó, según la **Ecuación 5**, la pérdida del ácido linoleico en el sistema lipídico, en la ausencia y la presencia de las sustancias estudiadas (Sección 2.6.3). La **Figura 22** muestra el “aumento” (la protección) de ALH causado por la adición de la vitamina E, con respecto a su cantidad remanente en la solución sometida a la oxidación, en ausencia de antioxidante.

La **Tabla 9** contiene información sobre el efecto protector en el sistema lipídico modelo de las sustancias estudiadas y las de referencia, usadas en concentraciones

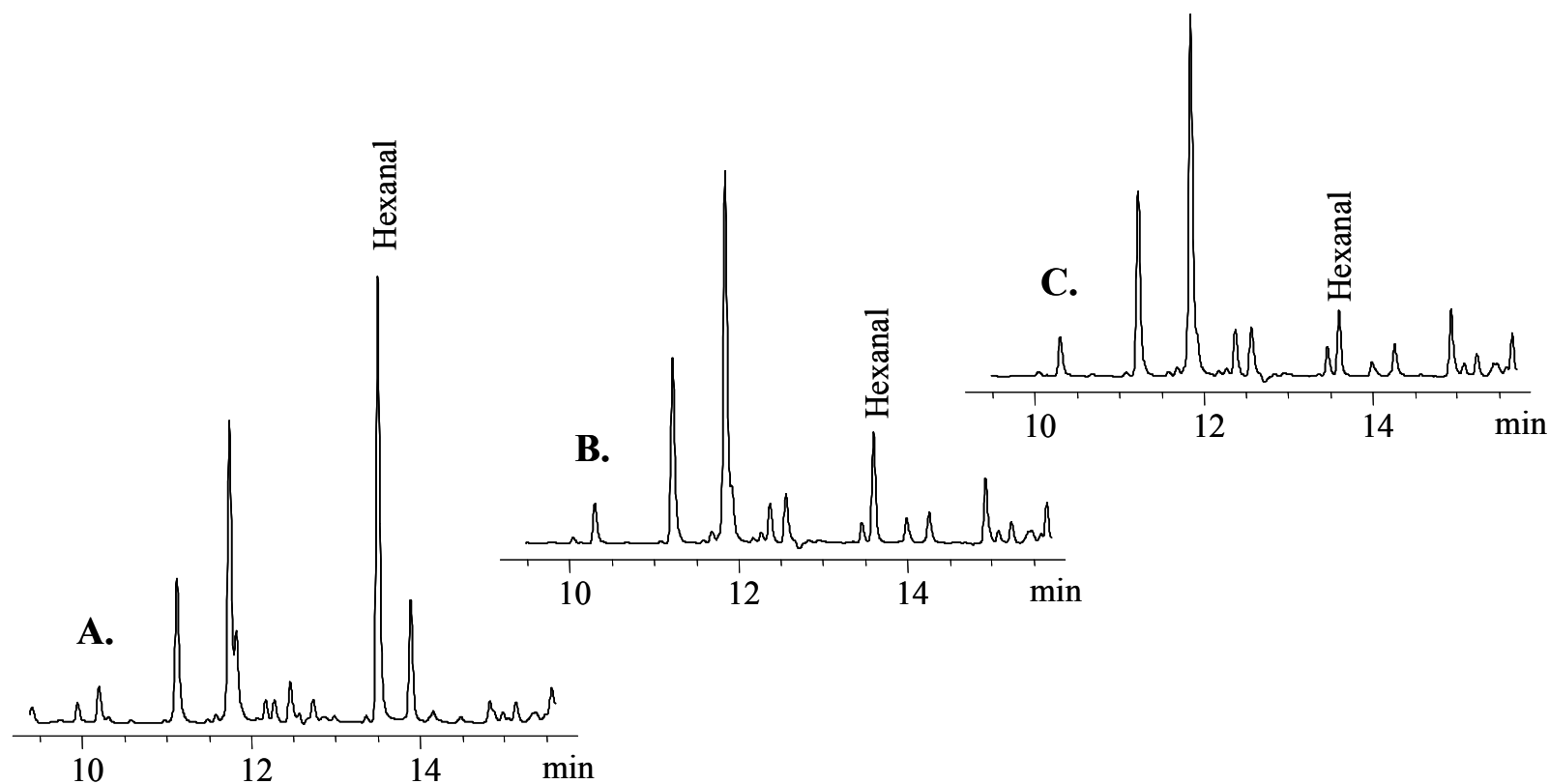


Figura 21. Efecto de la adición del extracto de hoja de coca sobre la cantidad del hexanal generado (medido como su derivado-PFPH), producido en la emulsión de ácido linoleico, sometida a la oxidación (Fe^{2+}). **A.** Blanco de ácido linoleico; **B.** Ácido linoleico + Extracto (5 g/L); **C.** Ácido linoleico + Extracto (20 g/L).

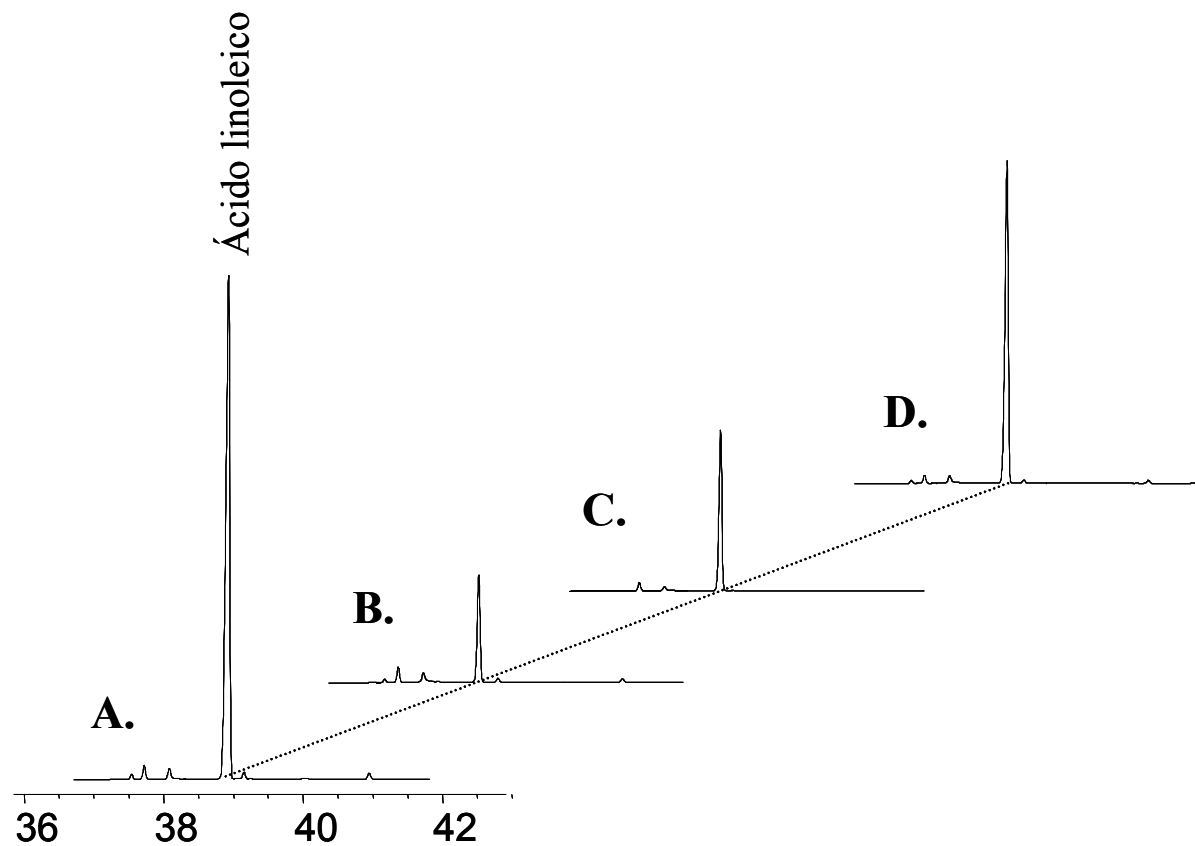


Figura 22. Efecto protector de la vitamina E sobre la cantidad del ácido linoleico (medido como su metiléster) remanente en la emulsión sometida a la oxidación (Fe^{2+}) **A.** Ácido linoleico inicial; **B.** Ácido linoleico sin vitamina E; **C.** Ácido linoleico + vitamina E (1 g/L) y **D.** Ácido linoleico + vitamina E (20 g/L).

Tabla 9. Incremento del hexanal y disminución del sustrato lipídico (ALH) provocados por la oxidación con Fe²⁺ del ácido linoleico después de la adición de las sustancias bajo estudio en diferentes concentraciones.

Concentración (g/L):		Efecto protector			
		1	5	10	20
		Disminución (%) de la cantidad del hexanal^a			
Medición del hexanal en la fase condensada (LLE)	Vitamina E	20 ± 7.2	83 ± 1.7	85 ± 1.2	92.9 ± 0.2
	BHA	81 ± 1.4	81 ± 1.5	82 ± 3.1	81 ± 1.1
	Hoja de coca	84 ± 3.1	88.8 ± 0.33	89.6 ± 0.35	93.7 ± 0.49
	Grano de café	1 ± 2.5	29 ± 11	52 ± 2.7	54 ± 4.5
	Cocaína	8 ± 6.1	27 ± 8.3	17 ± 3.6	19 ± 3.9
	Cafeína	12 ± 5.6	22 ± 8.9	16 ± 8.8	4 ± 2.3

Continuación **Tabla 9**

	Vitamina E	32 ± 1.7	55 ± 3.4	71 ± 4.3	79 ± 2.7
Medición del	BHA	55 ± 1.4	58 ± 1.5	53 ± 3.1	45 ± 1.1
hexanal en la	Hoja de coca	42 ± 7.8	49 ± 5.0	47 ± 5.7	61 ± 3.9
fase vapor	Grano de café	-7.5 ± 0.43	-1 ± 4.4	20.3 ± 0.23	27.0 ± 0.22
(HS-SPME)	Cocaína	2 ± 3.3	16 ± 7.8	6 ± 5.0	0 ± 2.7
	Cafeína	10 ± 5.0	15 ± 5.3	11 ± 1.6	10 ± 1.8
Protección (%) de la cantidad del ácido linoleico^a					
	Vitamina E	24 ± 4.2	30 ± 5.6	33 ± 9.8	56 ± 7.5
Cuantificación	BHA	48 ± 7.9	40 ± 6.9	74 ± 6.2	15 ± 5.5
del ALH en	Hoja de coca	52 ± 6.8	54 ± 7.1	67 ± 8.3	55 ± 5.7
forma de su	Grano de café	2 ± 1.1	8 ± 5.6	16 ± 5.2	15 ± 2.6
metiléster	Cocaína	0 ± 2.3	7 ± 4.6	2 ± 2.2	1 ± 2.0
	Cafeína	9 ± 5.1	40 ± 6.2	14 ± 6.1	3 ± 4.3

^a Valor promedio ± desviación estándar (n = 3).

entre 1 y 20 g/L. Los resultados son el promedio de tres mediciones, y aparecen con sus desviaciones estándar.

Por tratarse de un sistema lipídico en donde el ALH se encontraba en una emulsión, los antioxidantes de referencia protegieron el sustrato lipídico contra la oxidación muy eficientemente (20 – 93 %). La vitamina E presentó mayor o igual actividad que el BHA, lo cual concordó con los datos presentados por Salgar [19], Delgado [20] y Stashenko y colaboradores [24]. El siguiente fue el efecto protector de las sustancias estudiadas contra la oxidación del ALH: extracto de hoja de coca \geq vitamina E \geq BHA > extracto de grano de café tostado y molido > cafeína \geq cocaína.

En el presente trabajo, se usaron las tres técnicas de extracción y de derivación (LLE, HS-SPME y FAME's) para obtener los marcadores de la PL (hexanal y ALH) y relacionar su cantidad con la AA de las sustancias bajo estudio. La LLE es la técnica extractiva más antigua y aceptada para la obtención y cuantificación de diferentes analitos. Stashenko y colaboradores [23] encontraron porcentajes de recuperación de compuestos carbonílicos entre 51–79 % y límites de detección de 10^{-14} mol/mL (ECD); los autores recomendaron esta técnica analítica para medir los productos de la PL en alimentos, fluidos biológicos o, en este caso, para estudiar la AA *in vitro*.

Con el propósito de comparar los resultados obtenidos para los efectos protectores de las sustancias bajo estudio se usaron la LLE del hexanal con hexano y su derivación–extracción simultánea de la fase vapor, por HS-SPME. Stashenko y colaboradores [25] implementaron esta técnica como método alternativo para la medición de compuestos carbonílicos generados durante el tratamiento térmico de aceites, lo usaron para evaluar la AA *in vitro* de varios aceites esenciales, tales como cilantro (*Coriander sativum* L.), hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia negra (*Lepechina schiedeana*) y orégano (*Origanum vulgare* L.). La SPME presentó varias ventajas con respecto a la LLE en el análisis cuantitativo de analitos volátiles como el hexanal [40,55,56], puesto que permitió

evitar el uso de solventes costosos y preparar la muestra para el análisis cromatográfico en un solo paso (derivación–extracción–concentración). Además, se utilizó una décima parte (0.5 mL) de la solución oxidada de ALH (5 mL), para la extracción del hexanal.

La medición de la pérdida de los ácidos grasos fue otra manera de medir el grado de oxidación del ALH en el sistema modelo. Esta medición del efecto protector, permitió obtener información directa sobre los cambios que sucedieron al sustrato, i.e. ALH. En el Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, Hernán Fuentes [16] empleó la medición directa del ácido linoleico, para evaluar la AA de algunos productos naturales en la prevención de la degradación térmica del aceite vegetal.

En general, todas las mediciones realizadas (**Tabla 9**) mostraron desviaciones estándares entre 0.2 y 11 y tendencias muy similares para cada una de las sustancias bajo estudio. Sin embargo, de las tres técnicas de extracción usadas para evaluar la AA, la cuantificación del hexanal en la fase vapor de la muestra por HS–SPME–HRGC/ECD proporcionó menor dispersión de los resultados con desviaciones estándar entre 0.2 y 7.8, mientras que la medición de la AA, evaluada con base en la pérdida de ALH, fue la técnica que produjo mayor dispersión en los datos con desviaciones estándar entre 1.1 y 11.

3.3.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE GRANO DE CAFÉ TOSTADO Y MOLIDO Y HOJA DE COCA

En las **Figuras 23 – 25**, se presentan en forma gráfica los efectos protector, expresados en unidades de “Equivalentes de vitamina E”, de las sustancias y extractos bajo estudio. Los datos se presentan como el resultado de la división del efecto protector de cada sustancia sobre el efecto protector exhibido por la vitamina E, medido en el mismo sistema y para la misma concentración de antioxidante.

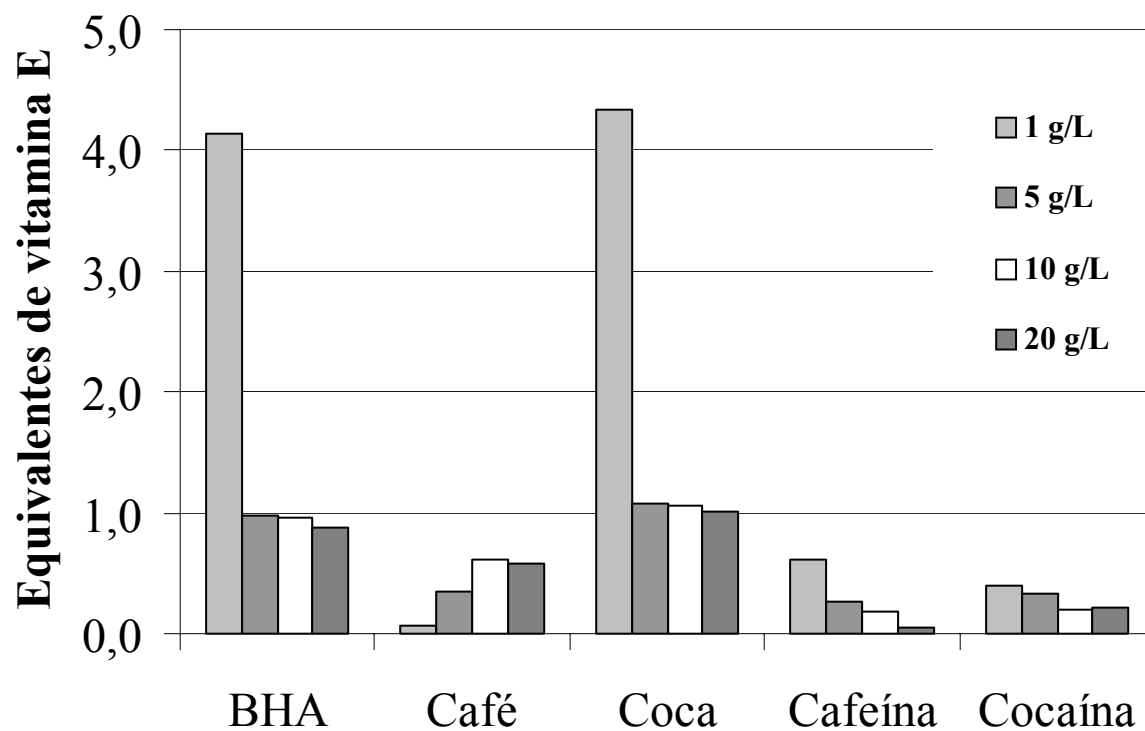


Figura 23. Actividad antioxidante, expresada en “Equivalentes de vitamina E” para el BHA, los extractos de grano de café tostado y molido y hoja de coca, cafeína y cocaína. Método de medición: derivación del hexanal con PFPH y extracción con hexano del derivado por LLE.

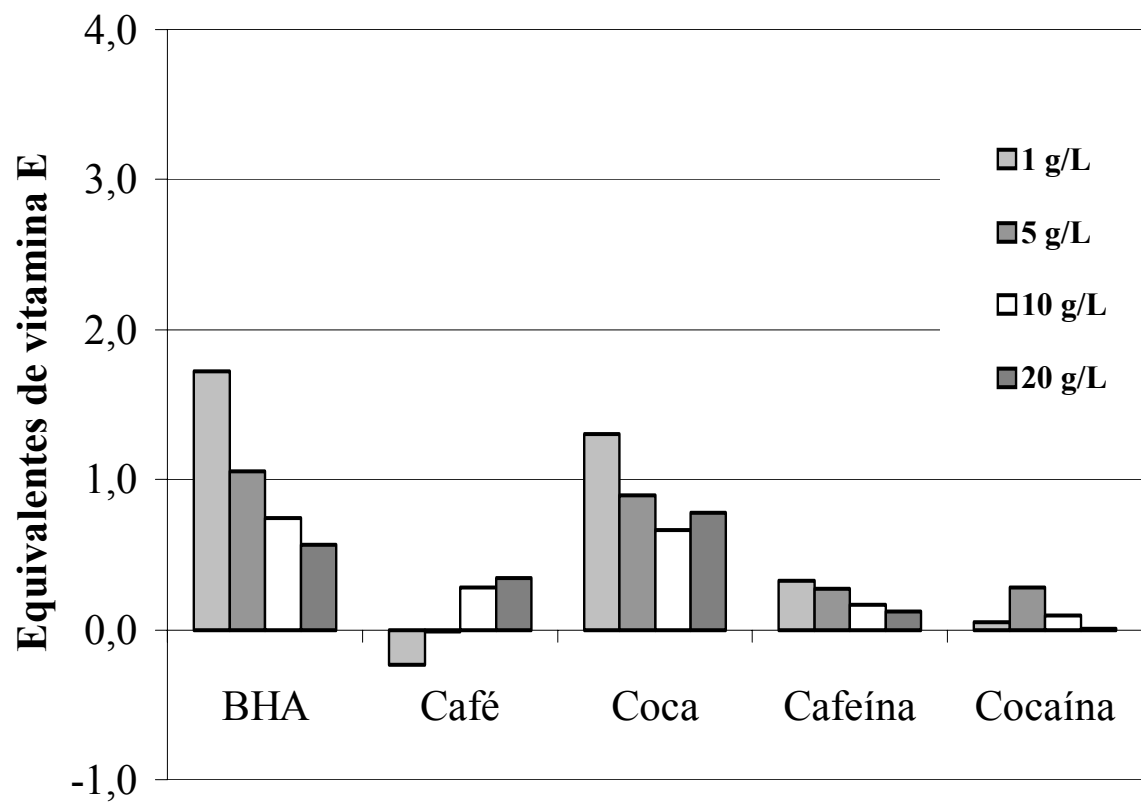


Figura 24. Actividad antioxidante, expresada en “Equivalentes de vitamina E” para el BHA, los extractos de grano de café tostado y molido, hoja de coca, la cafeína y la cocaína. Derivación con PFPH sobre la fibra y extracción del derivado de hexanal usando HS-SPME.

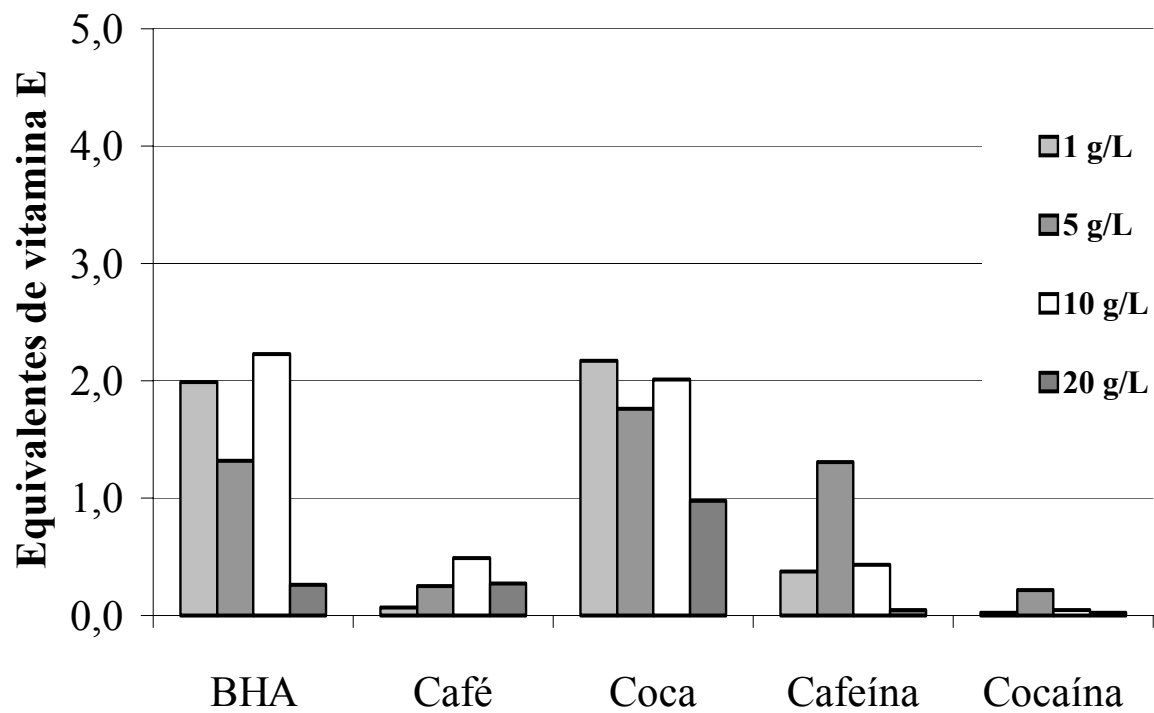


Figura 25. Actividad antioxidante, expresada en “Equivalentes de vitamina E” para el BHA, los extractos de grano de café tostado y molido, hoja de coca, cafeína y cocaína. Medición de la cantidad remanente del ácido linoleico en forma de su metiléster, según la fórmula de la ecuación 5 (Sección 2.6.3).

Los valores indican cuántas veces es más o menos activa cada sustancia en comparación con la vitamina E.

Para todas las concentraciones estudiadas (entre 1 – 20 g/L), el efecto protector del extracto de hoja de coca fue ca. 1 y 4 veces más alto que el presentado por la vitamina E. El extracto de café, mostró la tendencia de aumentar su actividad antioxidante con la concentración y presentó la AA en concentración superiores a 5 g/L, entre 0.1 y 0.6 veces la observada por la vitamina E. En concentraciones bajas (<5 g/L) el extracto de café no produjo efecto antioxidante, puede ser que ello se deba a la presencia del ácido linoleico en el extracto (**Figura 26A**). El ALH en el extracto podría provocar un aumento en la cantidad del hexanal generado durante la incubación de la muestra con respecto al hexanal medido en sistema modelo sin extracto (blanco). En el caso de la medición de la AA basada en la pérdida de ALH durante la peroxidación, la cantidad de ácido al inicio del experimento fue mayor (ALH proveniente del extracto + ALH del sistema modelo). Esto hace, que el denominador en la **Ecuación 5** sea más grande y, por lo tanto, un valor del efecto protector medido, más pequeño.

Shibamoto y colaboradores [15] determinaron que varios compuestos heterocíclicos presentes en el aroma del café, entre éstos, pirroles, tiazoles, tiofenos y tiazoles, poseen efecto protector contra la oxidación del hexanal a ácido hexanoico.

Anese y colaboradores [13] concluyeron que las bebidas de café poseen alta AA y a mayor grado de tueste aumentan sus propiedades antioxidantes. Este comportamiento se atribuyó a compuestos generados durante los procesos de tueste, principalmente, provenientes de las reacciones de Maillard. En el Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, Salazar y Armenta [60] estudiaron la composición de los volátiles del café en grano molido y algunas bebidas, extrayendo más de 325 compuestos e identificando más de 125 de ellos, entre

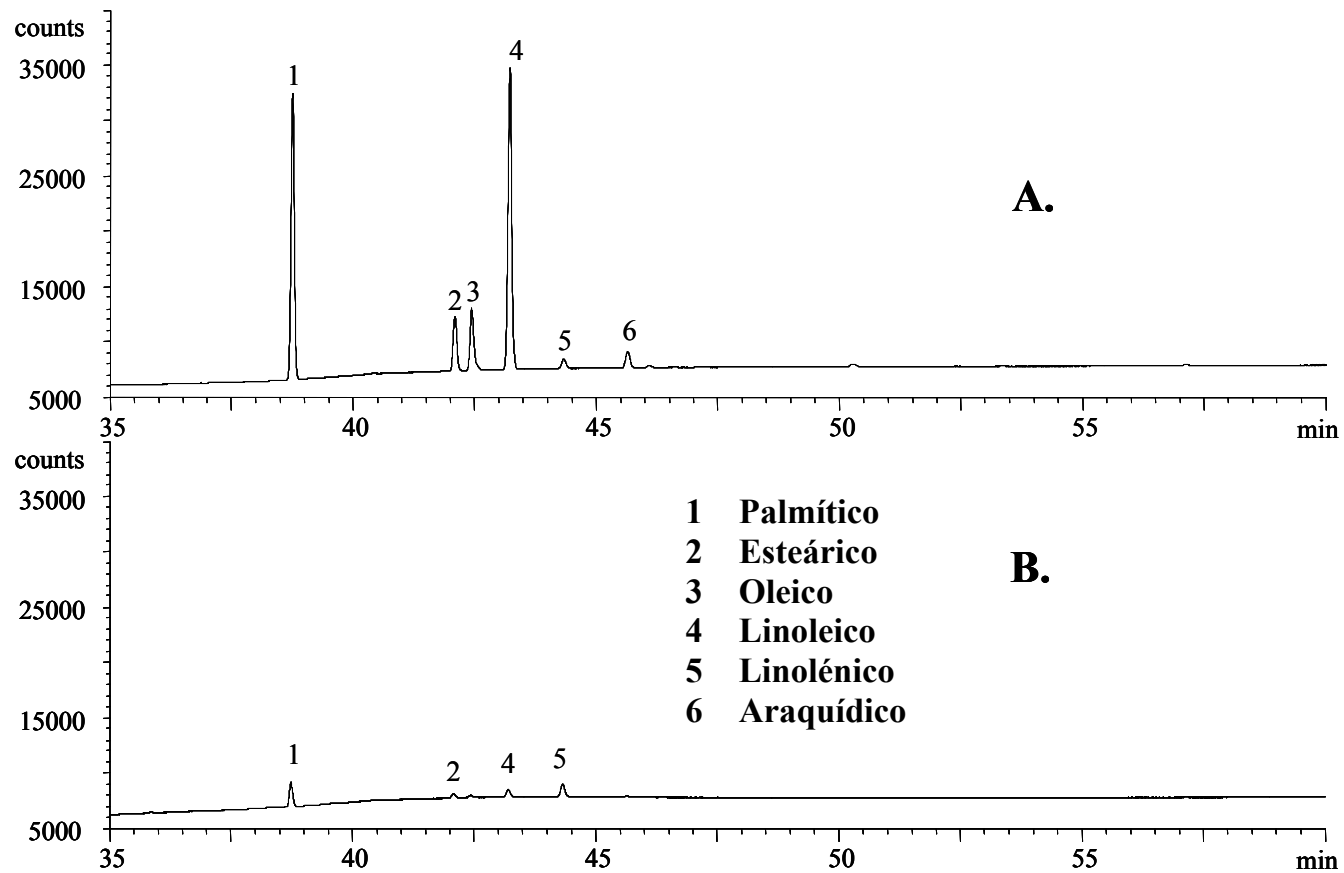


Figura 26. Perfil característico de metilésteres de ácidos grasos presentes en los extractos Soxhlet obtenidos de: **A.** Grano de café tostado y molido; **B.** Hoja de coca. Columna DB-WAX [poli(etilenglicol)]. (60 m). FID.

heterociclos (42%), aromáticos (13%), aldehídos y cetonas (14%), hidrocarburos (13%), ácidos orgánicos volátiles (0.02%) y ésteres (2%). Las autoras concluyeron, que entre los compuestos heterocíclicos se encuentran furanos, piridinas, pirazinas, pirroles, tiofenos, piranos y oxazoles, similares a los reportados por Bicchi y colaboradores [61]. Por otro lado, Nunes y coautores [62] identificaron compuestos de alto peso molecular, tales como polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos presentes en el extracto de café obtenido con agua caliente. Muchas de estas sustancias se relacionaron con la habilidad del extracto de inhibir la oxidación del ALH. Sin embargo, relacionar las propiedades antioxidantes de los extractos con cada constituyente de éste es extremadamente difícil, teniendo en cuenta, que los extractos de café y de hoja de coca presentaron alto grado de complejidad. Se deben tener en cuenta múltiples factores, tales como la presencia de quelantes de iones metálicos, atrapadores de especies radicalarias (*scavengers*), solubilidad de los componentes y además, si la fase fue dispersa o continua, la estructura química de los lípidos, la concentración de oxígeno y la interacción con otro tipo de componentes presentes en la matriz.

No obstante, se buscaron algunos compuestos que posiblemente estén relacionados con la AA de cada una de las plantas, para ello se realizó la caracterización parcial por GC/MS de los extractos obtenidos por Soxhlet. Se utilizó SFE como técnica alternativa de extracción, para estudiar más detalladamente la composición de los extractos de hoja de coca y grano de café tostado y molido y, para cuantificar los ácidos grasos presentes en los extractos. Además, se evaluaron las AA's de la cocaína y de la cafeína, compuestos puros, para establecer la posible relación entre la actividad de los extractos y sus alcaloides principales.

La caracterización por GC/MS de los extractos obtenidos por Soxhlet y SEF de hoja de coca y grano de café tostado y molido, reportó la presencia de una gran variedad de compuestos (véase **Figuras 27 – 30**).

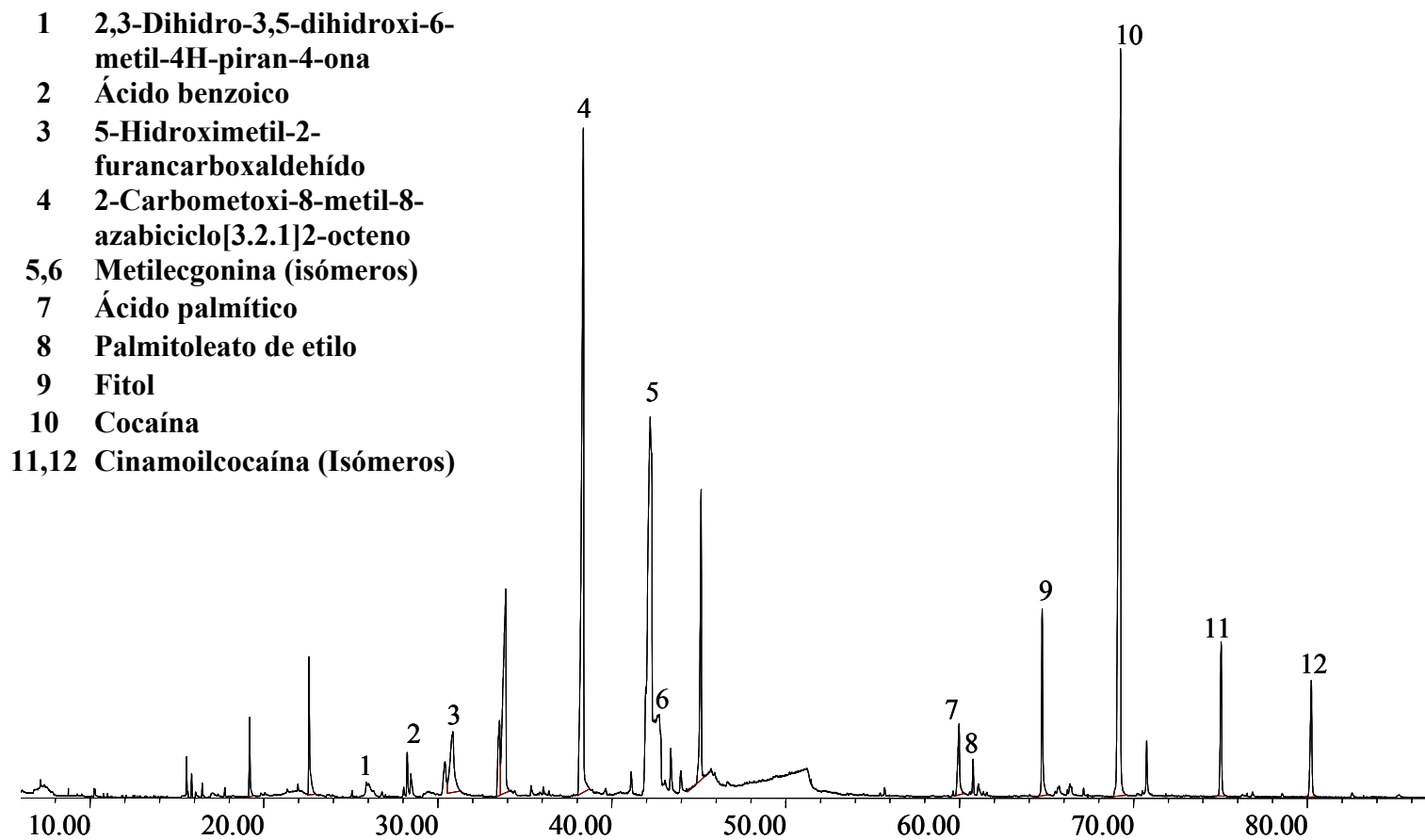


Figura 27. Corriente iónica total reconstruida del extracto Soxhlet de hoja de coca. Columna HP-5MS (60 m), MSD. EI (70 eV).

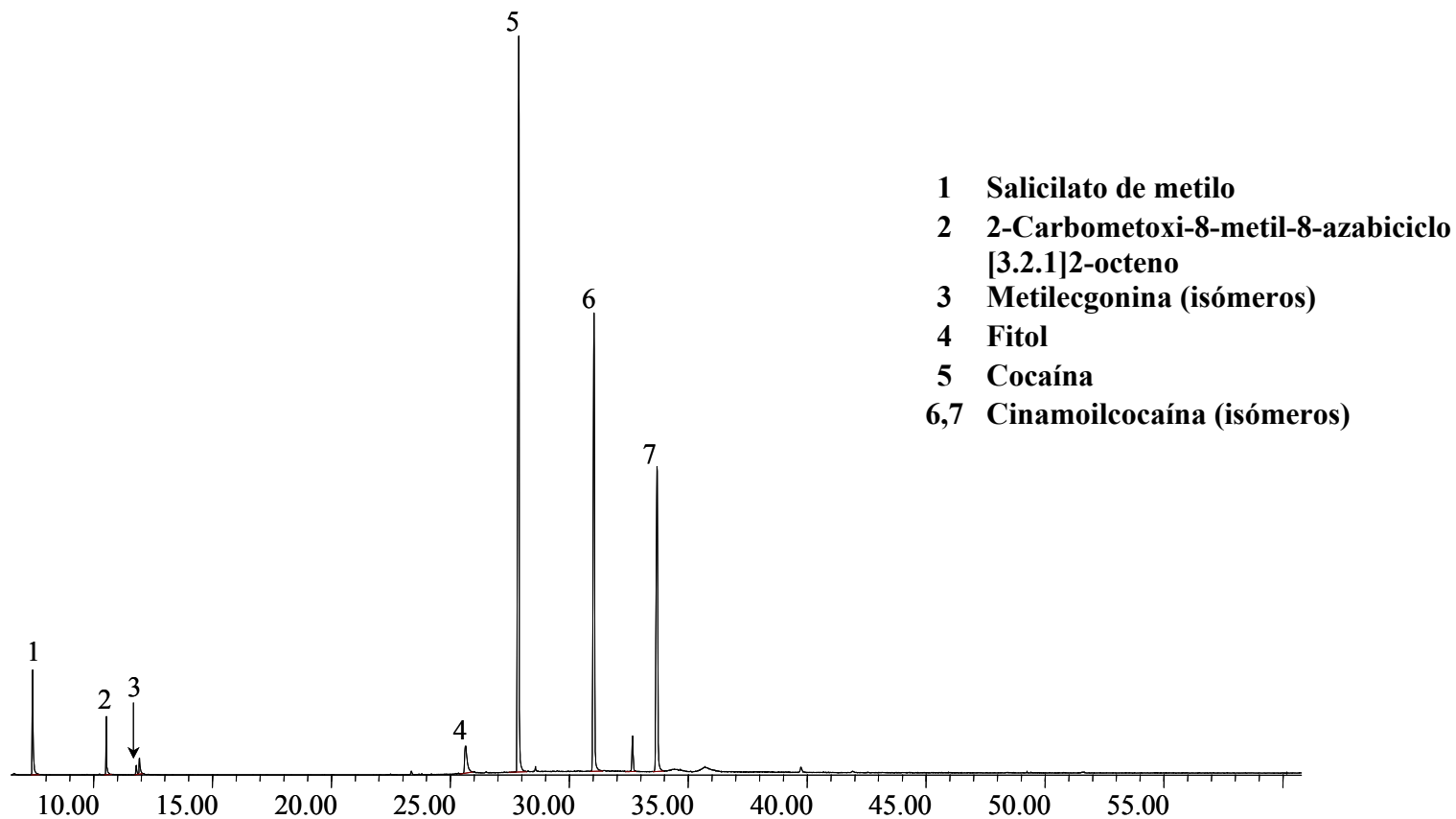


Figura 28. Corriente iónica total reconstruida del extracto de hoja de coca obtenido por SFE. Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV).

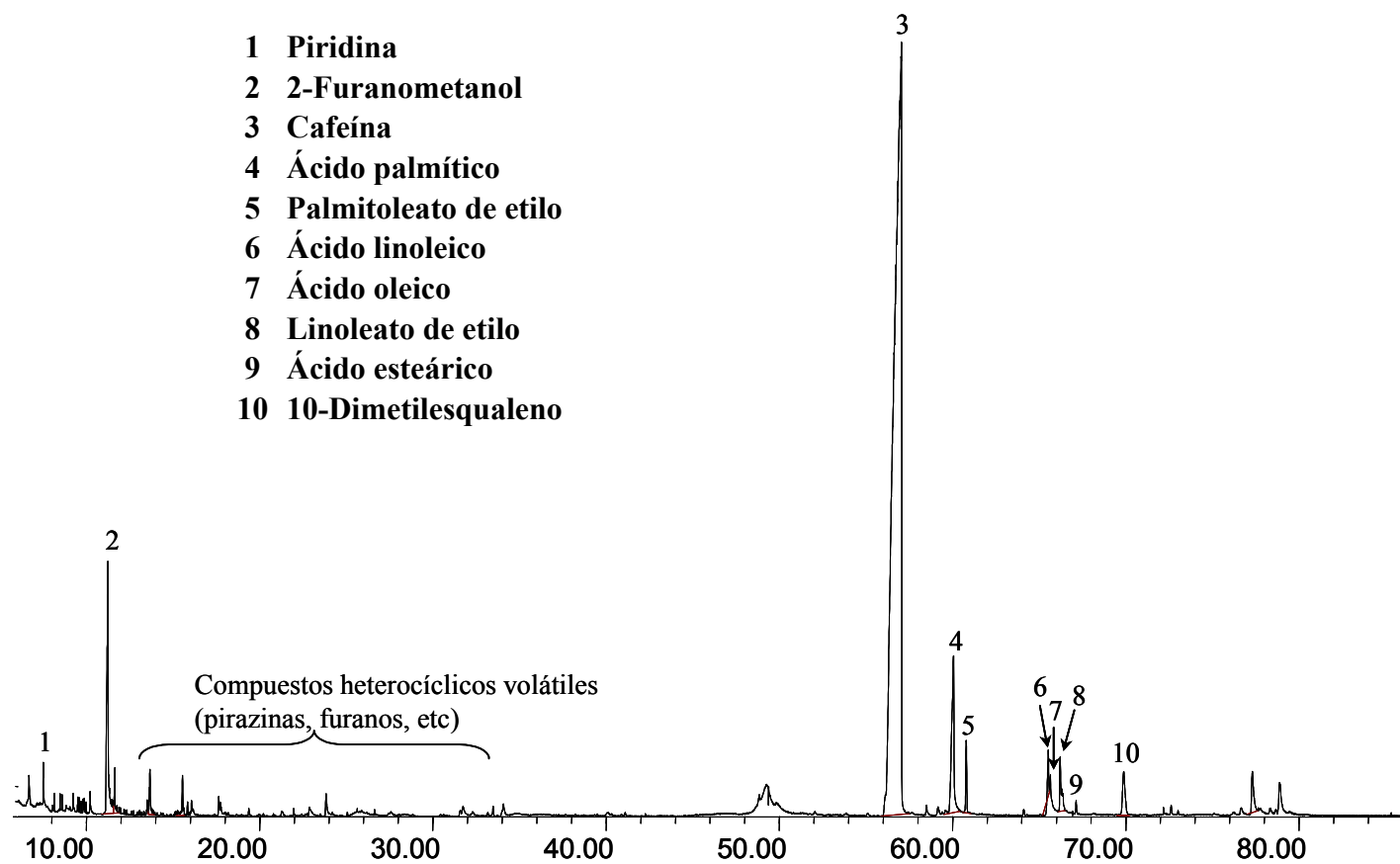


Figura 29. Corriente iónica total reconstruida de grano de café tostado y molido obtenido por extracción Soxhlet. Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV).

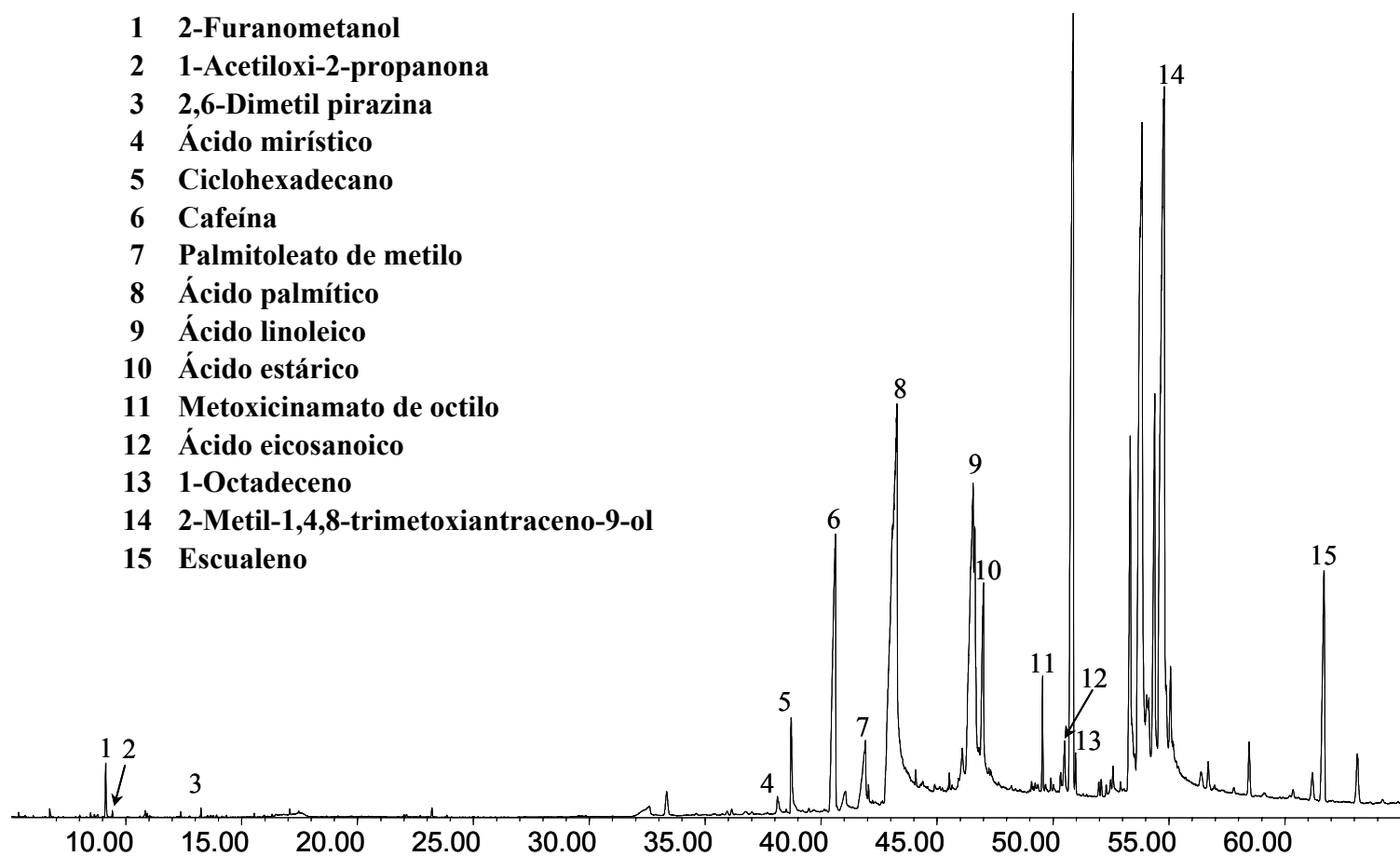


Figura 30. Corriente iónica total reconstruida de grano de café tostado y molido obtenido por SFE. Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV).

En el extracto de hoja de coca la mayoría de los compuestos detectados correspondieron a derivados de la cocaína, e.g. el 2-carbometoxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]2-octeno y los isómeros de metilecgonina. El principal componente fue la cocaína, junto con *cis*- y *trans*-cinamoilcocaínas.

El extracto de grano de café tostado y molido fue mucho más complejo que el de hoja de coca. Se identificaron principalmente ácidos grasos, cafeína y 2-furanometanol. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, tiene varias limitaciones para registrar compuestos presentes en los extractos. Por ejemplo, no se puede analizar compuestos no volátiles tales como pigmentos, carbohidratos, proteínas y algunos compuestos polares e.g. fenoles, co-extraídos de las hojas [63], y que pudieron ser los responsables de la AA observada en el extracto. Masuda y colaboradores [42] midieron la AA de extractos metanólicos de 39 plantas, usando las hojas de las plantas y tres métodos para evaluar la AA, a saber: DPPH•, oxidación de ALH y “muerte oxidativa” de células. Dos de las plantas (*Excoecaria agallocha* L. y *Terminalia catappa* L.) mostraron AA alta frente a la oxidación del ALH, superior a la de vitamina E. Los extractos se analizaron por HPLC, encontrándose como compuesto mayoritario el ácido ellágico (derivado fenólico). Stashenko y colaboradores [24] encontraron propiedades antioxidantes de aceites esenciales de cilantro, hinojo, romero, salvia negra y orégano, en los cuales se encontró una gran variedad de compuestos, e.g. aldehídos (decanal), alcoholes (linalool, undecanol y *trans*-anetol), hidrocarburos (γ -terpineno, limoneno y α - y β -pinenos, entre otros), cetonas (alcanfor) y compuestos fenólicos (timol y carvacol).

Por otra parte, se ha encontrado la relación, que existe entre la concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos crudos de plantas [76] y frutas [77] y su AA *in vitro* en diferentes sistemas lipídicos modelo. Los estudios [76,77] mostraron, que los compuestos fenólicos, tales como flavanoides, proporcionaron a

los extractos crudos la actividad antioxidante necesaria para evitar la transformación del hexanal al ácido hexanoico o la descomposición de metilésteres de ácidos grasos.

3.3.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS DE GRANO DE CAFÉ Y HOJA DE COCA

Los ácidos grasos, que se identificaron en los extractos Soxhlet de grano de café tostado y molido y de hoja de coca (**Figura 26**), son principalmente palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquídico. Se observa en la **Tabla 10**, que el extracto de grano de café tostado y molido contenía mayor cantidad de ácidos grasos (228 mg/g de extracto), que el de hoja de coca (30 mg/g de extracto). El ácido linoleico presente en el extracto de café hace el denominador de la Ecuación 5 más grande y, por lo tanto, un valor más pequeño de efecto protector medido por la cuantificación del ALH en forma de su metiléster. Esto puede explicar la AA aparentemente baja presentada por el extracto de café, con respecto a la determinada en otros estudios [12,15].

Para establecer el efecto de la cantidad de ALH presente en el extracto de grano tostado y molido de café sobre el efecto protector del mismo, se determinó un efecto protector corregido (EPC) de la siguiente manera: conociendo la cantidad de ALH (mg) presente en el extracto de café y en el sistema lipídico modelo [5 mg, (2 mL de solución de ALH 2.5 g/L)], se hizo una corrección al cálculo del efecto protector. La corrección consistió en tomar la cantidad (mg) de ALH total (ALH adicionado al inicio de la PL proveniente del extracto de café mas ALH presente en el sistema) adicionado al inicio de la PL como 100 %, y luego, estimar a qué porcentaje corresponden los mg de ALH remanente al final de la reacción (ALH adicionado al inicio de la PL proveniente del extracto de café mas ALH del sistema lipídico modelo que se protegió, según los cálculos de la **Ecuación 5**), siguiendo la **Ecuación 6**:

Tabla 10. Análisis cuantitativo de ácidos grasos de los extractos de grano de café tostado y molido y hoja de coca.

Ácido graso	<i>mg ácido graso/g de extracto*</i>	
	Grano de café	Hoja de coca
Palmítico	85 ± 3,9	13,06 ± 0,044
Esteárico	16,1 ± 0,84	2,7 ± 0,31
Oleico	20,5 ± 0,59	1,7 ± 0,23
Linoleico	97 ± 1,3	4,54 ± 0,051
Linolénico	3,9 ± 0,37	7,9 ± 0,44
Araquídico	5,9 ± 0,11	–
Total	228 mg/g de extracto	30 mg/g de extracto

* Valor promedio ± desviación estándar (n = 2)

$$EPC = \frac{ALH_f}{ALH_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

EPC – Efecto protector corregido.

ALH_f – Ácido linoleico remanente calculado al final de la PL en mg (ALH adicionado al inicio, proveniente del extracto de café mas ALH del sistema lipídico modelo que se protegió según los cálculos de la **Ecuación 5**).

ALH_i – Ácido linoleico remanente calculado al inicio de la PL en mg (ALH adicionado al inicio proveniente del extracto de café mas ALH presente en el sistema).

Para la concentración, e.g. de 1 g de extracto de café/ 1L de solución sometida a PL, se adicionaron al sistema lipídico modelo 0.485 mg de ALH, mas los 5 mg del ALH

presentes en el sistema lipídico, lo que equivale a 5.485 mg de ALH que corresponden a ALH_i de la **Ecuación 6**. Ahora, el ALH del sistema lipídico protegido después de sufrir el proceso de PL según la **Ecuación 5** fue del 2%, es decir, 0.1 mg del ALH más 0.485 mg del extracto de café, generan 0.585 mg de ALH al final de la PL (ALH_f). Entonces, el efecto protector corregido para el extracto de café a 1 mg/L es del 10%. En la **Tabla 11** se observa el efecto protector corregido obtenido para el extracto de grano de café tostado y molido, en las diferentes concentraciones estudiadas. Se observó un incremento del efecto protector entre 4 y 6 veces, con respecto a los efectos reportados en la **Tabla 9**. Los valores corregidos están entre 0.4 y 1.7 de “Equivalentes de la vitamina E”.

Tabla 11. Efecto protector corregido del extracto etanólico de grano de café tostado y molido.

Concentración, g/L	Efecto protector, %	Efecto protector corregido, %
1	2	10
5	8	38
10	16	57
20	15	71

En el extracto de hoja de coca los ácidos grasos se encontraron en proporción muy baja que, al parecer, no afectaron de manera significativa la AA total del extracto.

3.3.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA COCAÍNA Y LA CAFEÍNA

Como los alcaloides, cocaína y cafeína, son compuestos principales en los extractos de hoja de coca y grano de café tostado y molido, se estudió la AA de estas sustancias. La pureza de los alcaloides se determinó por GC/MS (**Figura 31 y 32**).

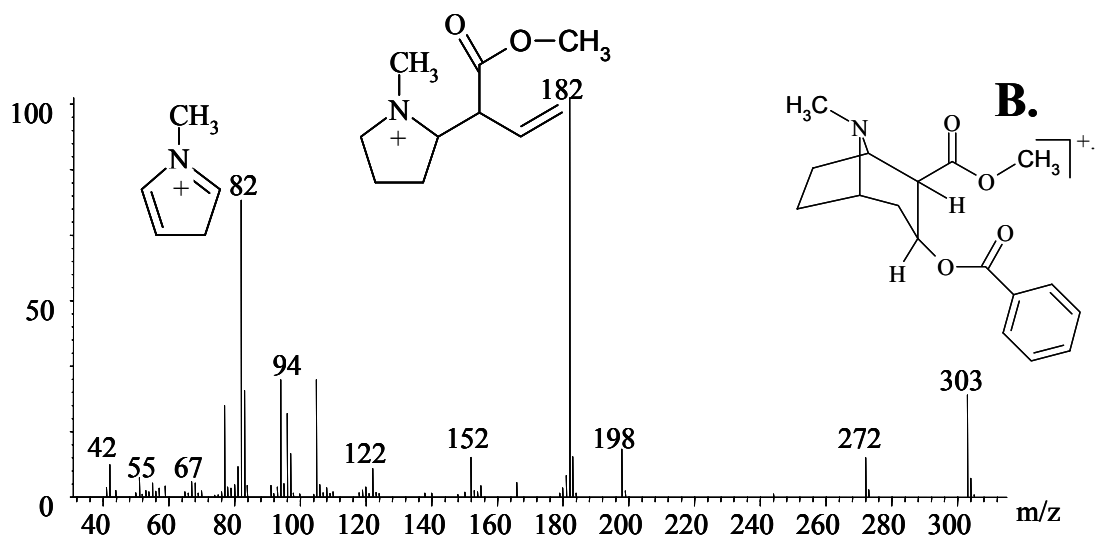
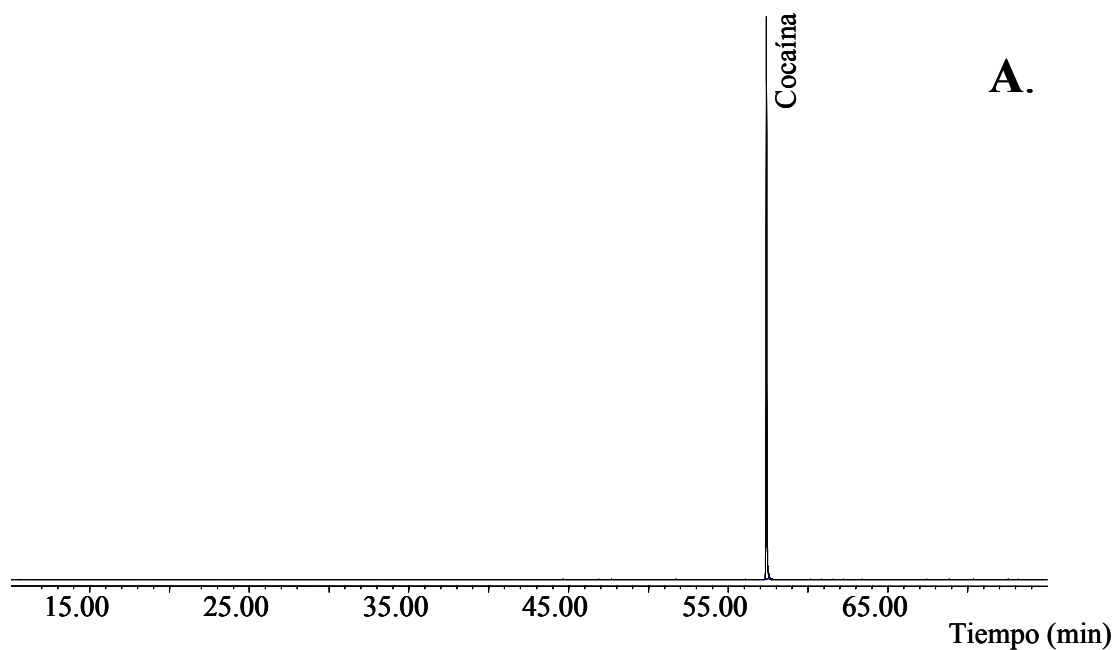


Figura 31. Corriente iónica total reconstruida de la cocaína (**A**) y su respectivo espectro de masas (**B**), donde aparecen estructuras correspondientes a los iones característicos ($M^{+\bullet}$, m/z 182 y m/z 82). Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV).

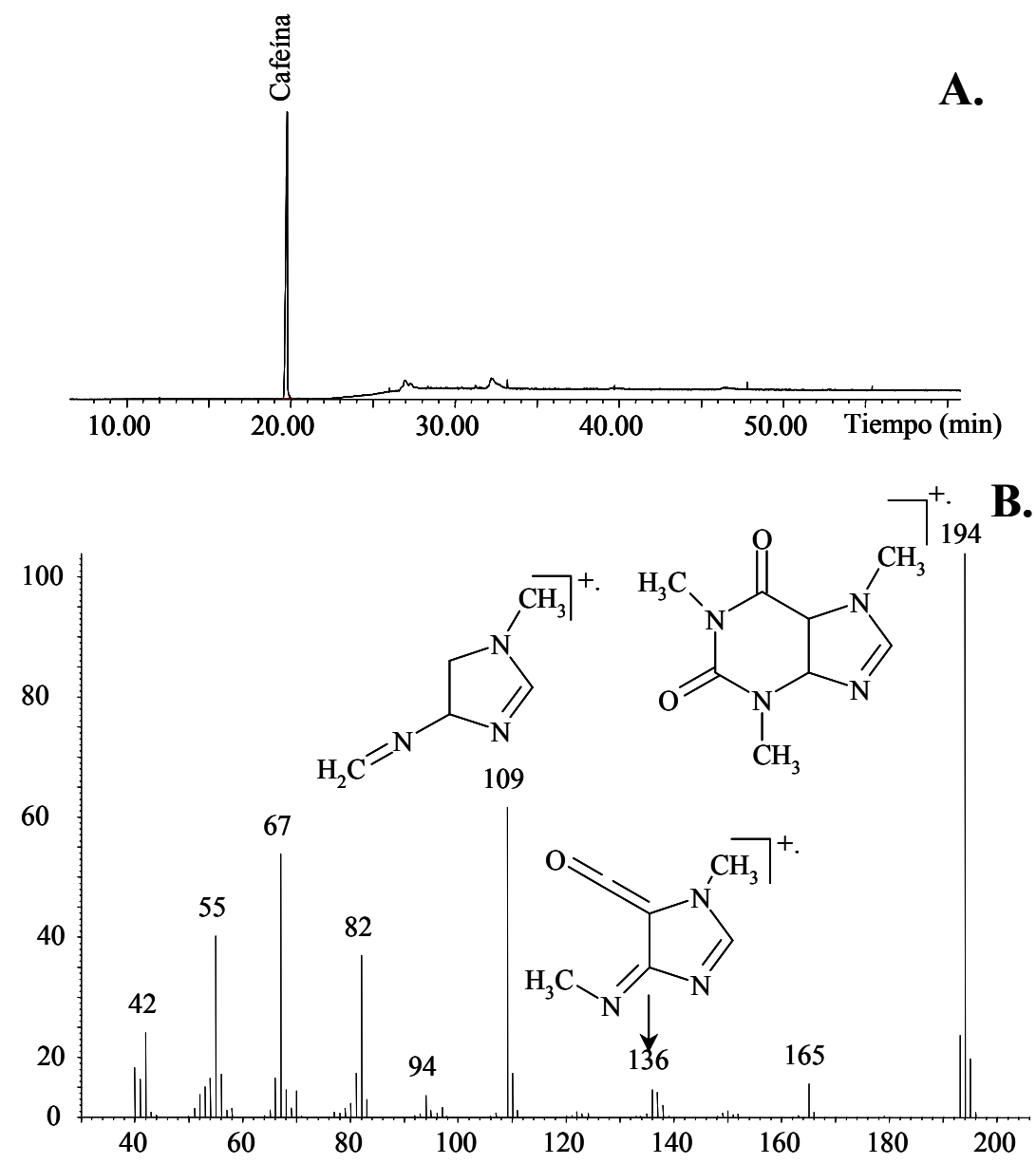


Figura 32. Corriente iónica total reconstruida de la cafeína (A) y su respectivo espectro de masas (B), donde aparecen estructuras correspondientes a los iones característicos (M^+ , m/z 136 y m/z 109). Columna HP-5MS (60 m). MSD. EI (70 eV).

La **Tabla 9** muestra el efecto protector de la cocaína y la cafeína. Al igual que en los extractos de grano de café tostado y molido y hoja de coca, el efecto protector se evaluó midiendo tanto el hexanal extraído por LLE/HS-SPME, como la “pérdida” del ácido linoleico que se cuantificó como su derivado metílico (FAME’s) en el sistema lipídico modelo.

Grosso modo, los alcaloides mostraron la AA inferior a los antioxidantes de referencia y los mismos extractos que los contienen, para todas las técnicas de análisis utilizadas. La excepción fue la solución de cafeína (1 g/L), que mostró AA más alta que el extracto de grano de café tostado y molido. El extracto de hoja de coca presentó actividad antioxidante superior a la de la cocaína para todas las concentraciones estudiadas. La mayor actividad de los alcaloides se observó en una concentración de 5 g/L, a saber: 27 y 22 % para la cocaína y la cafeína, respectivamente, mientras que a las mismas concentraciones los extractos de grano de café y hoja de coca, la vitamina E y el BHA presentaron los efectos protectores de 29, 89, 83 y 81 %, respectivamente.

La actividad antioxidante de la cafeína y la cocaína fue baja. No obstante, Stadler y colaboradores [14] estudiaron la AA de las bebidas de café y reportaron aumento en la concentración de 8-oxocafeína, producto de oxidación de la cafeína, durante la peroxidación lipídica al que fue sometida la bebida.

Aunque los alcaloides estudiados no poseyeran la AA elevada en el sistema lipídico modelo empleado en éste trabajo, sí la pueden ejercer en otros sistemas sometidos a al oxidación. Toda esta información permite tenerlos en cuenta en estudios computacionales que relacionen la actividad con la estructura molecular (QSAR).

4. CONCLUSIONES

1. Se evaluó la AA *in vitro* de los extractos etanólicos de hoja de coca y grano de café tostado y molido, la cocaína, la cafeína y las sustancias de referencia, la vitamina E y el BHA a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 g/L, en un sistema lipídico modelo, basado en la oxidación de ALH inducida por iones Fe^{2+} , en una solución buffer de trizma a pH 7.4, en ausencia de luz y en la presencia de oxígeno.
2. Para todas las concentraciones estudiadas, la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de hoja de coca fue similar o superior a la de la vitamina E y del BHA (hasta 4 veces más alta para la concentración de 1 g/L). El extracto de grano de café tostado y molido presentó la AA alta en concentraciones mayores de 5 g/L, pero no superior a la mostrada por las sustancias de referencia. El extracto no mostró efecto protector en la concentración de 1 g/L.
3. Los alcaloides puros, la cocaína y la cafeína presentaron la actividad antioxidante *in vitro* menor que las sustancias de referencia. Las sustancias de referencia, los alcaloides y los extractos estudiados exhibieron la actividad antioxidante *in vitro* en el siguiente orden descendente: **Extracto de hoja coca \geq Vitamina E \geq BHA $>$ Extracto de grano de café tostado y molido $>$ cafeína \approx cocaína.**
4. Las mediciones de la actividad antioxidante, realizadas por las tres diferentes técnicas de evaluación, proporcionaron resultados similares. Sin embargo, la HS-SPME, al igual que en otros estudios, fue una herramienta más rápida y sencilla para la determinación de compuestos carbonílicos, puesto que permitió el ahorro de solvente y tiempo de análisis.

5. RECOMENDACIONES

1. Debido al efecto protector alto exhibido por el extracto de hoja de coca (superior al de la vitamina E), se puede recomendar el fraccionamiento del extracto evaluar para evaluar la actividad antioxidante de cada fracción con el objetivo de buscar el(los) componente(s) responsable(s) de esta.
2. Estudiar la actividad antioxidante de los extractos de hoja de coca y de grano de café tostado y molido en otros sistemas, ya que la actividad antioxidante de los extractos puede depender tanto del sustrato que se oxida, como del método que se aplica para determinar la actividad antioxidante.
3. Explorar otras plantas típicas de Colombia, con posible actividad antioxidante y otras, tales como: insecticida, antifúngica, antiinflamatoria y anticancerígena, entre otros, con miras a explotar y aprovechar sabiamente la flora tropical abundante en variedad de especies.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. MARTÍNEZ CAYUELA M., Toxicidad de xenobióticos medida por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica*, **1998**, 39, 5-18.
2. GUTTERIDGE J. M., and HALLIWELL B., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd Ed., Clarendon Press: Oxford, **1989**, 543 p.
3. BELITZ H. D., and GROSCH W., *Food Chemistry*, 2nd Ed., Springer: Berlin, **1990**, 992 p.
4. GUTTERIDGE J., and HALLIWELL B., *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford university press: New York, **1994**, 143 p.
5. BADUI SALVADOR., *Química de los alimentos*, Alhambra Mexicana: México, **1996**, 213 p.
6. VINSON J., JANG J., YANG J., DABBAGH Y., LIANG X., SERRY M., PROCH J., and CAI S., Vitamins and specially flavanoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2502-4.
7. POKORNY J., YANISHLIEVA N., and GORDON M., *Antioxidants in Food: Practical Applications*, CRC Press: Cornwall, **2001**, 381 p.
8. SVOBODA K., and HAMPSON J. B., Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory, and other related pharmacological activities: <http://www.csl.gov.uk/ienica/Seminars/SPEC%20CHEMS/svoboda.pdf>, enero de **2002**.
9. CASTRO J. F., CAICEDO N. y MALDONADO L. F., *Los cultivos ilícitos, política mundial y realidad en Colombia*, Defensoría del Pueblo, Bogotá, **2000**, 190 p.
10. <http://www.cafedecolombia.com/> mayo de **2002**.
11. <http://www.dane.gov.co/> mayo de **2002**
12. GAZZANI G, DAGLIA M, PAPETTI A, GREGOTTI C., and BERTÈ F., In

- vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1449-54.
13. ANESE MONICA and NICOLI CRISTINA., Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 942-6.
 14. STADLER RICHARD and FAY LAURENT., Antioxidative reactions of caffeine: formation of 8-oxocaffeine (1,3,7-trimethyluric acid) in coffee subjected to oxidative stress, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 1332-8.
 15. FUSTER M. D., MITCHELL A. E., OCHI H., and SHIBAMOTO T., Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5600-4.
 16. FUENTES HERNÁN, *Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de la cromatografía gaseosa de alta resolución y evaluación in vitro de la AA de productos naturales*: Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **1999**.
 17. SEQUEDA L. GONZALO, *Desarrollo de un método de derivación y análisis cuantitativo de productos finales de la peroxidación lipídica*: Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2000**.
 18. FERREIRA L. MARIA C., *Desarrollo y validación de un método para el análisis cuantitativo de compuestos carbonílicos, productos finales de la degradación oxidativa de lípidos*: Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **1997**.
 19. SALGAR WILLIAM, *Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia labiatae*: Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2001**.
 20. DELGADO WILMAN, *Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de tres aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia umbelliferae*, Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2001**.

21. CONTRERAS NELSON, *Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta*: Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2002**.
22. PUERTAS MIGUEL A., *Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante in vitro de algunos productos naturales y sintéticos*: Tesis Doctoral, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2002**.
23. STASHENKO E. E., FERREIRA M. C., SEQUEDA L. G., MARTÍNEZ J. R., and WONG J. W., Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 779, 360-9.
24. STASHENKO E. E., PUERTAS M. A., and MARTÍNEZ J. R., SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 373, 70-74.
25. STASHENKO E. E., PUERTAS M. A., SALGAR W., DELGADO W., and MARTÍNEZ J. R., Solid-phase micro extraction with on-fiber derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 886, 175-181.
26. SIES HELMUNT., *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press: London, **1991**, 650 p.
27. MADHAVI D. L., DESHPANDE S. S., and SALUNKHE D. K., *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, Marcel Dekker: New York, **1996**, 491 p.
28. GURR M., and HARWOOD J., *Lipid Biochemistry. An Introduction*. Chapman & Hall: New York, **1991**, 406 p.
29. HALLIELL, BARRY, Reactive oxygen species in living systems, *Am. J. Medicine*, **1991**, 91, 1-14.
30. GUERRA ELEJALDE J. I., Oxidación, entre la vida y la enfermedad, *An. Med. Interna (Madrid)*, **2001**, 18, 1-4.

31. MILLER DENNIS D., *Química de alimentos. Manual de Laboratorio*, Limusa: México, **2001**, p. 72-82.
32. CONTRERAS N., SALGAR W., DELGADO W., MARTÍNEZ J. y STASHENKO E., *Libro de resúmenes: IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía*, COLACRO IX, Cartagena de Indias, Febrero **2002**, p. 182.
33. MURPHY ROBERT, Free-radical-induced oxidation of arachidonodyl plasmalogen phospholipids: antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids, *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, 14, 463-72.
34. SPITELLER G. and LOIDL-STAHLMHOFEN A., α -Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1211, 156-60.
35. KUIJK F., HOLTE L. and DRATZ E., 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized decosahexaenoic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1043, 116-8.
36. FUNG-LUNG C. and HAUGH-JYUN C., Epoxidation of *trans*-4-hidroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 306-12.
37. BENZIE I., and SZETO Y. T., Total antioxidant capacity of teas by ferric reducing/ antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 633-6.
38. SÁNCHEZ-MORENO C., SATUÉ-GRACIA T. and FRANKEL E., Antioxidant activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5581-7.
39. SANCHEZ-MORENO C., LARRUARI J. A., RUPÉREZ P., and SAURA-CALIXTO F., Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1603-6.
40. PUERTAS-MEJÍA M., HILLEBRAND S., STASHENKO E., and WINTERHALTER P., *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil, *Flavour Fragr. J.*, **2002**, 17, 380-4.
41. STASHENKO E. E., FERREIRA C., SEQUEDA G., MATEUS A., CERVANTES M., y MARTÍNEZ J., Desarrollo de un método para el monitoreo

- de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales, *Arte y ciencia cosmética*, **1997**, 8, 20-7.
42. MASUDA T., YONEMORI S., OYAMA Y., TAKEDA Y., TANAKA T., ANDOH T., SHINOHARA A., and NAKATA M., Evaluation of antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1749-54.
 43. MÄKINEN M., KAMAL-ELDIN A., ANNA-MAIJA L., and HOPIA A., Effets of α - and γ -tocopherols on formation of hidrperoxides and two decomposition products from methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77, 801-806.
 44. ZHI-SHENG J., BO ZHOU; LI YANG; LONG-MIN WU, and ZHONG-LI L., Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1998**, 2, 911-15.
 45. VALGIMIGLI L., BANKS J. T., LUSZTYK J., and INGOLD K. U., Solvent effects on the antioxidant activity of vitamine E, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3381-83.
 46. AL-MALAIKA S., GOODWIN C., ISSENHUTH S., and BURDICK D., The antioxidant role of α -tocoferol in polimers II. Melt stablising effect in polypropilene, *Polymer Degradation and Stability*, **1999**, 64, 145-56.
 47. OTOMO S., KOBAYASHI Y., SAKO T., and TAMAMOTO Y., Studies of tetrazoles as rubber chemicals. II. Reactivities and antioxidation activities of reactive antioxidants based on tetrazoles, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1984**, 29, 89-98.
 48. DAS P. K., DATTA R. N., and BASU D. K., Retarding and antioxidant activity of 1-ciclohexylthio-2-mercaptobenzimidazole in the vulcanization of NR accelerated by thiocarbamyl sulfenamide, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1987**, 34, 1977-83.
 49. GARG M. L., WOOD L. G., FITZGERALD D. A., GIBSON P. G., and COOPER D. M., Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma, *Lipids*, **2000**, 35, 967-74.

50. DE ZWART L. L., MEERMAN J. H., COMMANDEUR J. N., and VERMEULEN N. P., Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans, *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26, 202-26.
51. BLOOMFIELD M. S., The spectrophotometric determination of hydroperoxide and peroxide in a lipid pharmaceutical product by flow injection analysis, *Analyst*, **1999**, 124, 1865-71.
52. JEN-KUN LIN., and HUNG-YI WU, Determination of aldehydic lipid peroxidation products with dabsylhydrazine by high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1603-12.
53. YASUHARA A., and SHIBAMOTO T., Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 94-7.
54. HOSHIKA YASUYUKI, Sensitive gas chromatographic determination of lower aliphatic carbonyl compounds as their pentafluoropnenylhydrazones, *J. Chromatogr.*, **1978**, 152, 224-27.
55. PAWLISZYN JANUSZ, *Applications of Solid Phase Microextraction*, Royal Society of Chemistry: UK, **1999**, 653 p.
56. SNOW NICHOLAS, Review: Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 885, 445-55.
57. MAGDIC S., and PAWLISZYN J., *Determination of acetone and C₁-C₄ alcohols using automated SPME*, Varian Application note, N° 14, p. 1-3.
58. ELMORE J. S., MOTTRAN D. S., ENSER M., and WOOD J. D., Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1619-25.
59. PARK P. W., and GOINS R. E., *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods, *J. Food Sci.*, **1994**, 59, 1262-66.
60. SALAZAR C. y ARMENTA J., M. *Aislamiento e identificación por HRGC-NPD-ECD-FID-MS de los componentes volátiles del café tostado en grano, molido y en sus bebidas*: Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2001**.

61. BICCHI C, PANERO O, PELLEGRINO G, and VANNI A., Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction – gas chromatography and principal components analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 4680-6.
62. NUNES F. M., and COIMBRA M. A., Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted *Arabica* coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1773-82.
63. CASALE J. F., and KLEIN R. F., Illicit production of cocaine, *Forensic Sci. Rev.*, **1993**, 5, 95-106..
64. KARCH STEVEN, *A brief history of cocaine*, CRC Press: Boca Raton, **1998**, p. 302.
65. HARBORNE J. B., and BAXTER H., *Phytochemical Dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants*, Tailor & Francis: Great Britain, **1993**, p. 474
66. ARANDA J. M., SÁNCHEZ A. y GIMENO M. J., Abuso de drogas: cocaína, heroína por inhalación, *Manual de farmacia hospitalaria*, Almería, 578-82.
67. GOODMAN G. A., RALL T. W., NIES A. S., and TAYLOR P., Las bases farmacológicas de la terapéutica, 8^{va} ed., Panamericana: México D. F., **1991**, p. 333.
68. GLASS M. RICHARD, Adicción a la cocaína, *JAMA*, **2002**, 287, 1.
69. SALGAR RANGEL WILLIAM, *Determinación y cuantificación de cocaína en muestra de orina*: Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **1998**.
70. www.afic.org/pdfs/180.pdf, mayo de **2002**.
71. www.cicad.oas.org, mayo de **2002**.
72. PRIOR W., STRICKLAND T., and CHURCH D., Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 110, 2224-9.

73. BONDET V., CUVELIER M., and BERSET C., Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: focus on linoleic acid peroxidation induced by iron/ascorbic acid system, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77, 813-8.
74. SHIBAMOTO TAKAYUKI, and LEE KWANG, Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4947-52.
75. MEI L., MCCLEMENTES J. and DECKER E., Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants in emulsion droplets, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2267-73.
76. KÄHKÖNEN M., HOPIA A., VUOLERA H., RAUHA J., PIHLAJA K., KUJALA T. and HEINONEN M., Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3954-3962.
77. GIL M., I. TOMÁS F. A., HESS B., HOLCROFT D. M., and KADER A. A., Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 4581-89.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MALAIKA S. et al, The antioxidant role of α -tocoferol in polimers II. Melt stabilising effect in polypropilene, *Polymer Degradation and Stability*, **1999**, 64, 145-56. [46]

ANESE MONICA and NICOLI CRISTINA., Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 942-6. [13]

ARANDA J. M. et al, Abuso de drogas: cocaína, heroína por inhalación, Manual de farmacia hospiltalaria, Almería, 578-82. [66]

BADUI SALVADOR., Química de los alimentos, Alhambra Mexicana: México, **1996**, 213 p. [5]

BELITZ H. D., and GROSCH W., Food Chemistry, 2nd Ed., Springer: Berlin, **1990**, 992 p. [3]

BENZIE I., and SZETO Y. T., Total antioxidant capacity of teas by ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 633-6. [37]

BICCHI C. et al, Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction – gas chromatography and principal components analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 4680-6. [61]

BLOOMFIELD M. S., The spectrophotometric determination of hydroperoxide and peroxide in a lipid pharmaceutical product by flow injection analysis, *Analyst*, **1999**, 124, 1865-71. [51]

BONDET V. et al, Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: focus on linoleic acid peroxidation induced by iron/ascorbic acid system, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77, 813-8. [73]

CASALE J. F., and KLEIN R. F., Illicit production of cocaine, *Forensic Sci. Rev.*, **1993**, 5, 95-106. [63]

CASTRO J. F. et al, Los cultivos ilícitos, política mundial y realidad en Colombia, Defensoría del Pueblo, Bogotá, **2000**, 190 p. [9]

CONTRERAS N. et al, Libro de resúmenes: IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía, COLACRO IX, Cartagena de Indias, Febrero **2002**, p. 182. [32]

_____, Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta: Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2002**. [21]

DAS P. K. et al, Retarding and antioxidant activity of 1-ciclohexylthio-2-mercaptobenzimidazole in the vulcanization of NR accelerated by thiocarbamyl sulfenamide, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1987**, 34, 1977-83. [48]

DE ZWART L. L. et al, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans, *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26, 202-26. [50]

DELGADO WILMAN, Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de tres aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia umbelliferae, Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2001**. [20]

ELMORE J. S. et al, Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1619-25. [58]

FERREIRA L. MARIA C., Desarrollo y validación de un método para el análisis cuantitativo de compuestos carbonílicos, productos finales de la degradación oxidativa de lípidos: Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **1997**. [18]

FUENTES HERNÁN, Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de la cromatografía gaseosa de alta resolución y evaluación in vitro de la AA de productos naturales: Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **1999**. [16]

FUNG-LUNG C. and HAUGH-JYUN C., Epoxidation of trans-4-hidroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide, *Chem. Res. Toxicol.*, **1996**, 9, 306-12. [36]

FUSTER M. D. et al, Antioxidantive activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5600-4. [15]

GARG M. L. et al, Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma, *Lipids*, **2000**, 35, 967-74. [49]

GAZZANI G. et al, In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1449-54. [12]

GIL M., I. TOMÁS F. A., HESS B., HOLCROFT D. M., and KADER A. A., Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 4581-89. [77]

GLASS M. RICHARD, Adicción a la cocaína, *JAMA*, **2002**, 287, 1. [68]

GOODMAN G. A. et al, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 8va ed., Panamericana: México D. F., **1991**, p. 333. [67]

GUERRA ELEJALDE J. I., Oxidación, entre la vida y la enfermedad, *An. Med. Interna* (Madrid), **2001**, 18, 1-4. [30]

GURR M., and HARWOOD J., Lipid Biochemistry. An Introduction. Chapman & Hall: New York, **1991**, 406 p. [28]

GUTTERIDGE J. M., and HALLIWELL B., Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed., Clarendon Press: Oxford, **1989**, 543 p. [2]

_____, Antioxidants in Nutrition, Health and Disease. Oxford university press: New York, **1994**, 143 p. [4]

HALLIELL, BARRY, Reactive oxygen species in living systems, *Am. J. Medicine*, **1991**, 91, 1-14. [29]

HARBORNE J. B., and BAXTER H., Phytochemical Dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants, Tailor & Francis: Great Britain, **1993**, p. 474. [65]

HOSHIKA YASUYUKI, Sensitive gas chromatographic determination of lower aliphatic carbonyl compounds as their pentafluoropnenylhydrazones, *J. Chromatogr.*, **1978**, 152, 224-27. [54]

<http://www.cafedecolombia.com/> mayo de **2002**. [10]

<http://www.dane.gov.co/> mayo de **2002**. [11]

JEN-KUN LIN., and HUNG-YI WU, Determination of aldehydic lipid peroxidation products with dabsylhydrazine by high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1603-12. [52]

KÄHKÖNEN M. et al, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3954-3962. [76]

KARCH STEVEN, A brief history of cocaine, CRC Press: Boca Raton, **1998**, p. 302. [64]

KUIJK F. et al, 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized decosahexaenoic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1043, 116-8. [35]

MADHAVI D. L. et al, Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives, Marcel Dekker: New York, **1996**, 491 p. [27]

MAGDIC S., and PAWLISZYN J., Determination of acetone and C1-C4 alcohols using automated SPME, Varian Application note, No 14, p. 1-3. [57]

MÄKINEN M. et al, Effects of α - and γ -tocopherols on formation of hydroperoxides and two decomposition products from methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77, 801-806. [43]

MARTÍNEZ CAYUELA M., Toxicidad de xenobióticos medida por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica*, **1998**, 39, 5-18. [1]

MASUDA T. et al, Evaluation of antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1749-54. [42]

MEI L. et al, Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants in emulsion droplets, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2267-73. [75]

MILLER DENNIS D., Química de alimentos. Manual de Laboratorio, Limusa: México, **2001**, p. 72-82. [31]

MURPHY ROBERT, Free-radical-induced oxidation of arachidonodyl plasmalogen phospholipids: antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids, *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, 14, 463-72. [33]

NUNES F. M., and COIMBRA M. A., Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted Arabica coffee, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1773-82. [62]

OTOMO S. et al, Studies of tetrazoles as rubber chemicals. II. Reactivities and antioxidation activities of reactive antioxidants based on tetrazoles, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1984**, 29, 89-98. [47]

PARK P. W., and GOINS R. E., In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods, *J. Food Sci.*, **1994**, 59, 1262-66. [59]

PAWLISZYN JANUSZ, Applications of Solid Phase Microextraction, Royal Society of Chemistry: UK, **1999**, 653 p. [55]

POKORNY J. et al, Antioxidants in Food: Practical Applications, CRC Press: Cornwall, **2001**, 381 p. [7]

PRIOR W. et al, Comparison of the efficiencies of several natural and synthetic antioxidants in aqueous sodium dodecyl sulfate micelle solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 110, 2224-9. [72]

PUERTAS MIGUEL A., Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante in vitro de algunos productos naturales y sintéticos: Tesis Doctoral, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2002**. [22]

_____. et al, In vitro radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil, *Flavour Fragr. J.*, **2002**, 17, 380-4. [40]

SALAZAR C. y ARMENTA J., M. Aislamiento e identificación por HRGC-NPD-ECD-FID-MS de los componentes volátiles del café tostado en grano, molido y en sus bebidas: Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2001**. [60]

SALGAR RANGEL WILLIAM, Determinación y cuantificación de cocaína en muestra de orina: Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **1998**. [69]

_____, Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia labiatae: Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2001**. [19]

SANCHEZ-MORENO C. et al, Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1603-6. [39]

_____, Antioxidant activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 5581-7. [38]

SEQUEDA L. GONZALO, Desarrollo de un método de derivación y análisis cuantitativo de productos finales de la peroxidación lipídica: Tesis de pregrado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **2000**. [17]

SHIBAMOTO TAKAYUKI, and LEE KWANG, Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4947-52. [74]

SIES HELMUNT., Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, Academic Press: London, **1991**, 650 p. [26]

SNOW NICHOLAS, Review: Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices, *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 885, 445-55. [56]

SPITELLER G. and LOIDL-STAHLMHOFEN A., α -Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1211, 156-60. [34]

STADLER RICHARD and FAY LAURENT., Antioxidative reactions of caffeine: formation of 8-oxocaffeine (1,3,7-trimethyluric acid) in coffee subjected to oxidative stress, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 1332-8. [14]

STASHENKO E. E. et al, Desarrollo de un método para el monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales, *Arte y ciencia cosmética*, **1997**, 8, 20-7. [41]

_____, Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 779, 360-9. [23]

_____, SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 373, 70-74. [24]

_____, Solid-phase micro extraction with on-fiber derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 886, 175-181. [25]

SVOBODA K., and HAMPSON J. B., Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory, and other related pharmacological activities: <http://www.csl.gov.uk/ienica/Seminars/SPEC%20CHEMS/svoboda.pdf>, enero de **2002**. [8]

VALGIMIGLI L. et al, Solvent effects on the antioxidant activity of vitamine E, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3381-83. [45]

VINSON J. et al, Vitamins and specially flavanoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2502-4. [6]

www.afic.org/pdfs/180.pdf, mayo de **2002**. [70]

www.cicad.oas.org, mayo de **2002**. [71]

YASUHARA A., and SHIBAMOTO T., Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 94-7. [53]

ZHI-SHENG J. et al, Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1998**, 2, 911-15. [44]