

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.

CARRERA DE FARMACIA



“A LA LIBERTAS POR LA UNIVERSIDAD”

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO EN LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA

“Determinación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en extractos etanolicos obtenidos del fruto del *Cocos nucifera*”.

Autores:

- ❖ Br. Ana Guadalupe González Garmendia.
- ❖ Br. Alexander José Hernández Lira.
- ❖ Br. Hazzell Magaly Izaguirre Velázquez.

Tutor: Msc; Fernando E. Baca.

DICIEMBRE 2012

2012; AÑO DEL BICENTENARIO Y LA REFUNDACION DE LA UNAN-LEON



DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a quienes colaboraron para lograr alcanzar el ideal que nos propusimos y en especial:

A Dios:

Que ha iluminado nuestro camino dándonos el pan del día a día y el don de pensar y vivir.

A nuestros padres y familiares:

Por su abnegación, cariño, comprensión y apoyo incondicional.

A nuestros profesores, profesoras y personal en general:

Por su ejemplo a seguir de altruismo, generosidad y sabiduría



AGRADECIMIENTOS

Por haber concluido nuestro trabajo investigativo y con ella nuestra carrera, queremos brindar nuestros más sinceros agradecimientos a:

DIOS: por habernos brindado vida, salud, entendimiento y sabiduría para concluir con nuestros estudios universitarios.

NUESTROS PADRES Y FAMILIARES: por su apoyo incondicional desde nuestra llegada a este mundo hasta estos momentos.

A NUESTROS MAESTROS: Por habernos transmitido sus conocimientos día a día en las aulas de clases.

A NUESTROS COMPAÑEROS: Por habernos acompañado de la mano durante los años de nuestra carrera y habernos dado su amistad incondicional.

**INDICE**

Contenido	Paginas.
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Marco teórico.....	4
3.1. Clasificación Taxonómica de la planta.....	4
3.2. Descripción Botánica.....	4
3.3. Composición Química en el fruto del coco.....	6
3.4. Radicales Libres	7
3.5. Actividad Antioxidante.....	8
3.5.1. Equilibrio entre especies reactivas y mecanismo antioxidante	10
3.5.2. Clasificación de los antioxidantes.....	10
3.5.3. Tipos de antioxidantes.....	11
3.5.4. Papel de los antioxidantes.....	18
3.5.5. Metodologías de la evaluación de la actividad antioxidante.....	19
3.5.6. Factores que afectan la actividad antioxidante de los extractos.....	20
3.6. Métodos de extracción y separación.....	22
4. Material y método.....	27
4.1. Operacionalización de variables.....	28
4.2. Parte experimental.....	28
4.3. Método de extracción.....	29
4.4. Ensayo de la actividad antioxidante.....	30
5. Resultados y discusión	33
6. Conclusiones.....	36
7. Recomendaciones.....	37
8. Bibliografía.....	38
9. Anexos.....	41



1. INTRODUCCION

Se entiende por antioxidante cualquier molécula, capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: Los radicales libres y aquellas especies que sin ser radical libres, son suficiente reactivas para inducir la oxidación de los sustratos.⁽¹⁾

Cuando el número de radicales libres aumentan en el organismo humano y estos, se inestabilizan producen resultados negativos en la salud, un ejemplo de ello lo constituye la relación que existe entre estas moléculas y ciertas enfermedades de carácter degenerativo, como son las alteraciones del aparato circulatorio, sistema nervioso y otras enfermedades muy graves como el cáncer o el envejecimiento precoz.⁽²⁾

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han promovido la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como potenciales agentes terapéuticos, unido a la creciente preocupación por los efectos tóxicos producidos por los antioxidantes sintéticos utilizados en la preservación de alimentos, esto refuerza la urgencia de obtener sustancias antioxidantes menos tóxicas y de amplia utilidad en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, siendo los vegetales una potencial fuente de obtención debido a que sintetizan y acumulan en sus órganos gran variedad de metabolitos secundarios como respuesta a estímulos o condiciones ambientales, entre ellos, sustancias con capacidad captadora de radicales libres tales como compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y compuestos nitrogenados.⁽²⁾

Un estudio encontrado en la cual se evaluó la capacidad actividad antioxidante de extractos etanolicos totales de frutos y semillas en 36 plantas de la región del caribe Colombiana en la universidad de Cartagena (Acacia collinsii saff, Annona muricaata L, Ambrosia peruviana, cappariss odoratissima, etc), hace referencia que las plantas constituyen una fuente potencial de moléculas con la capacidad de inhibir a los radicales libre.⁽²⁾



Debido a los potenciales efectos antioxidantes que pueden presentar los componentes activos de las plantas, hemos enfocado nuestro interés en la especie *cocos nucifera*, ya que varias documentaciones encontradas describen sus propiedades nutritivas y regenerativas, cuyo fruto es una fuente de vitaminas C, E y ácido fólico etc., para el cual emplearemos el método de ensayo de la actividad captadora del radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), determinando el porcentaje de inhibición del radical provocado por los extractos etanolicos.⁽³⁾

Por lo tanto este trabajo representa un gran aporte a trabajos investigativos futuros al brindar información constatada sobre una opción terapéutica a partir de la especie vegetal *cocos nucifera* evaluando la capacidad antioxidante de diferentes extractos obtenidos a partir del fruto.



2. OBJETIVOS.

➤ **Objetivo General:**

- ❖ Determinar la actividad antioxidante de los compuestos presentes en los extractos etanolicos obtenidos del fruto del *Cocos nucifera*.

➤ **Objetivos Específicos:**

- ❖ Extraer los componentes fitoquímicos presentes en el fruto del *Cocos nucifera*.
- ❖ Evaluar la actividad antioxidante, de los extractos etanolicos obtenidos del fruto del *Cocos nucifera*.
- ❖ Determinar el porcentaje de inhibición del radical DPPH, provocada por los extractos etanolicos del *Cocos nucifera*.



3. MARCO TEÓRICO.

3.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA. ⁽³⁾

Reino	Plantae
División	Maganoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Arecales
Familia	Arecaceae
Subfamilia	Arecoideae
Tribu	Cocoeae
Subtribu	Butiinae
Genero	Cocos
Especie	Cocos nucifera

El nombre *Cocos* deriva probablemente de un término portugués que significa mono, quizás por la semejanza de la nuez, con sus tres poros germinativos, a la boca de los simios. El nombre específico *nucifera* deriva del latín, y significa portador de nueces (de *fero*= yo porto y *nux-nucis* = nuez).⁽⁴⁾

Origen: (Muy discutido) probablemente nativa del Sureste Asiático y/o las Islas del pacífico. Algunos autores sugieren un origen caribeño.⁽⁵⁾

3.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

El *Cocos nucifera* L. o el Cocotero es una planta muy longeva, puede alcanzar los 100 años de vida; tiene un tronco único, alto hasta 20-30 metros, con corteza lisa y gris marcada por las cicatrices anulares de las hojas viejas.⁽⁵⁾

Las **hojas**, de 4 a 6 m de largo, son pinnadas, compuestas por folíolos linear-lanceolados, más o menos recurvados, rígidos y de color verde brillante.⁽⁵⁾

Las inflorescencias, que nacen en la axila de las hojas, están envueltas por una espata carenada, son espádices ramificados en los que las flores femeninas se disponen en la base



y las masculinas en el ápice. Las flores tienen pétalos lanceolados, 6 estambres y un ovario formado por 3 carpelos soldados.⁽⁵⁾

La polinización es cruzada, de tipo anemófila o entomófila.⁽⁵⁾

El fruto, es una drupa que puede llegar a pesar entre 1-2 kg de masa con epicarpio delgado, liso y de color marrón grisáceo, mesocarpio fibroso, de unos 4-8 cm y endocarpio leñoso; siendo ligero puede ser transportado por el mar a grandes distancias, sin que su germinación sea perjudicada.⁽⁵⁾

En el interior contiene una única semilla rica en sustancias de reserva localizadas en el endospermo, que es en parte líquido (leche de coco) y en parte sólido (pulpa).⁽⁵⁾

En el momento de la germinación del embrión, la radícula atraviesa uno de los tres poros germinativos visibles también desde el exterior.⁽⁵⁾

Los cocoteros se clasifican en función de su altura. Dentro de cada clase existe un gran número de variedades que se diferencian generalmente por las características del fruto.⁽⁵⁾

- **Gigantes:** se emplean para la producción de aceite y los frutos para consumo fresco. Su contenido de agua es elevado y su sabor poco dulce. Entre sus ventajas destacan el tamaño del fruto y el contenido elevado de copra. Las variedades gigantes más cultivadas son: Gigante de Malasia (GML), Gigante de Renell (GRL) de Tahití, Gigante del Oeste Africano (GOA) de Costa de Marfil, Alto de Jamaica, Alto de Panamá, Indio de Ceilán, Java Alta, Laguna, Alto de Sudán, etc.⁽⁶⁾
- **Enanos:** las variedades más cultivadas son Amarillo de Malasia (AAM), Verde de Brasil (AVEB) de Río Grande del Norte, Naranja Enana de la India. Debido al buen sabor del agua y el pequeño tamaño de estos cocos, se emplean fundamentalmente para la producción de bebidas envasadas. La copra es de mala calidad.⁽⁶⁾
- **Híbridos:** producto del cruce entre las anteriores variedades. Son frutos de tamaño mediano o grande, buen sabor y buen rendimiento de copra. El híbrido más cultivado es



MAPAN VIC 14; un cruce entre Enano de Malasia y Alto de Panamá y Colombia, específicamente Sabaneta.⁽⁶⁾

3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA EN EL FRUTO DEL COCO.⁽⁷⁾

- ❖ Agua (en la carne) 4%
- ❖ Hidratos de carbono 82% (4% fibra): Glucosa, levulosa, inulina, celulosa.
- ❖ Lípidos 3%: Grasas saturadas y monosaturadas.
- ❖ Proteínas 8%
- ❖ Sales minerales: Calcio 156 mg/100 g; Fósforo 200 mg/100 g; potasio 405 mg/ 100 mg ;Magnesio 52 mg/ 100 g
- ❖ Vitamina C (Ácido ascórbico) 146 mg/100 g
- ❖ Vitamina B1(Tiamina) 0,1 mg/100 g
- ❖ Vitamina B2(Riboflavina) 0,1 mg/100 g
- ❖ Vitamina B9 (Ácido fólico) 1,6 mg/100 g
- ❖ Vitamina E(α -tocoferol) 0,7 mg/ 100 g

La composición del coco varía a medida que éste madura. La grasa constituye el principal componente tras el agua y es rica en ácidos grasos saturados (88,6% del total), por lo que su valor calórico es el más alto de todas las frutas. Aporta una baja cantidad de hidratos de carbono y menor aún de proteínas. Así mismo, el coco es rico en sales minerales que participan en la mineralización de los huesos (magnesio, fósforo, calcio) y en potasio. En cuanto a otros nutrientes, destaca su aporte de fibra, que mejora el tránsito intestinal y contribuye a reducir el riesgo de ciertas alteraciones y enfermedades. El magnesio se relaciona con el funcionamiento de intestino, nervios y músculos, forma parte de huesos y dientes, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante. El fósforo participa en el metabolismo energético. El potasio es necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso, para la actividad muscular normal e interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. Destaca además su contenido de vitamina E, de acción antioxidante y de ciertas vitaminas hidrosolubles del grupo B, necesarias para el buen funcionamiento de nuestro organismo.⁽⁶⁾



El coco es un fruto muy aromático y de sabor intenso y agradable. Teniendo en cuenta sus propiedades nutritivas, su consumo ocasional y en cantidades moderadas, se considera adecuado para todos los segmentos de la población sana: niños, jóvenes, adultos, deportistas, mujeres embarazadas, madres lactantes y personas mayores.⁽⁶⁾

El consumo "excesivo" de alimentos ricos en grasas saturadas provoca un aumento de los niveles de colesterol en sangre (hipercolesterolemia). Sin embargo, el coco es una fruta que en la mayoría de los países latinoamericanos se consume en cantidades muy pequeñas y contadas ocasiones, por lo que su consumo en fresco no plantea ningún inconveniente para la salud, es más, enriquece nuestra alimentación en sustancias nutritivas, sabores, aromas y en gran cantidad de platos de nuestra gastronomía.⁽⁶⁾

La fibra previene o mejora el estreñimiento, contribuye a reducir las tasas de colesterol en sangre y al buen control de la glucemia (niveles de azúcar en la sangre) en la persona que tiene diabetes. Por su alto valor energético, deben moderar su consumo las personas que tienen exceso de peso y por su elevado aporte de potasio, no se aconseja a quienes tienen insuficiencia renal y requieren de una dieta controlada en dicho mineral. Sin embargo, quienes toman diuréticos y las personas con bulimia se beneficiarán de su consumo, ya que en el coco abunda dicho mineral.⁽⁶⁾

El agua de coco es el líquido que se halla en el interior de la pulpa; cuanto menos maduro esté el fruto más abundante será y también más rico en nutrientes. Se considera una bebida isotónica natural, siendo muy apreciada en los países tropicales donde se toma extrayéndolo directamente del fruto.⁽⁶⁾

La copra es el aceite que se obtiene del fruto, seco y reducido a trozos. La grasa de copra contiene un 65% de aceite. Por saponificación e hidrogenación se obtiene manteca y aceite de coco (grasas hidrogenadas y saturadas).⁽⁶⁾

3.4. RADICALES LIBRES.

En química, un **radical** (antes referido como **radical libre**) es una especie química (orgánica o inorgánica), en general es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo por poseer un electrón desapareado.⁽⁸⁾



Las moléculas endógenas o exógenas que son receptoras de electrones (como es el caso del oxígeno) reaccionan fácilmente con radicales libres y se convierten ellas mismas en radicales; estas moléculas se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Estos compuestos incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo ($-OH$), los cuales inducen el daño oxidativo de biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleícos); este daño eventualmente produce enfermedades degenerativas en humanos.⁽⁹⁾

Un número limitado y controlado de estos elementos resulta beneficioso para el organismo, por su papel que desempeña en el organismo dentro del sistema inmunológico, dado que son capaces de eliminar microorganismos patógenos pero cuando el número de radicales aumenta y se inestabilidad produce resultados negativos. Así, por ejemplo, se ha visto la relación que existe entre estas moléculas y ciertas enfermedades de carácter degenerativo, como alteraciones del aparato circulatorio, sistema nervioso y otras enfermedades muy graves, como el cáncer, o el envejecimiento precoz. Estos resultados negativos se producen porque los radicales libres alteran el ADN de las células, impidiendo la renovación celular o alterando su normal funcionamiento.⁽⁹⁾

3.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

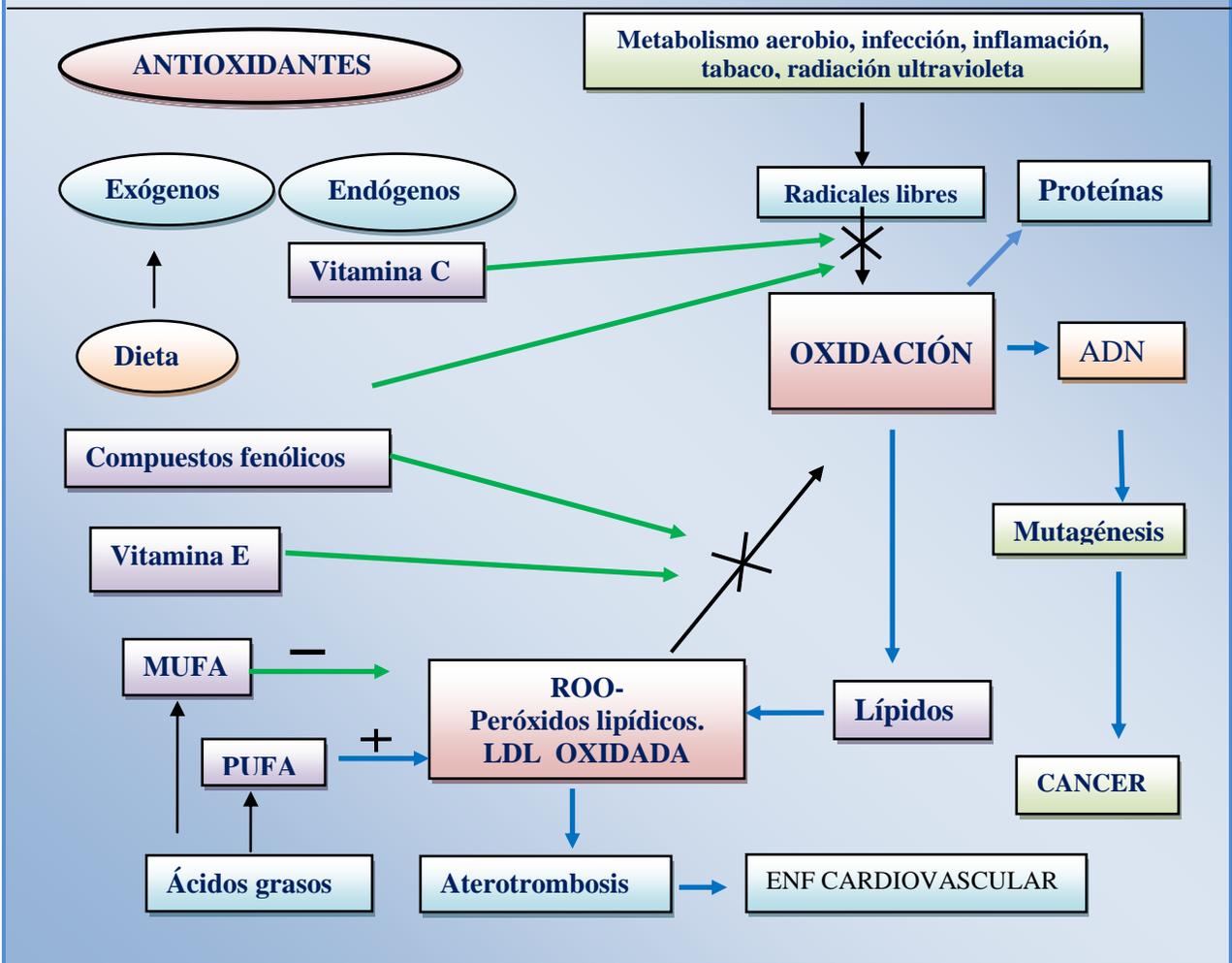
Antioxidante: Son sustancia con la capacidad de eliminar los radicales libres que se producen en el organismo.⁽⁹⁾

Los antioxidantes son entonces, compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al terminar el inicio o la propagación de la cadena de reacciones de oxidación. Esta actividad antioxidante también se le atribuye a otras especies químicas diferentes a los polifenoles, como lo son las vitaminas, carotenoides, terpenos, alcaloides, flavonoides, lignanos.⁽⁹⁾

En nuestro organismo, la producción de los radicales libres que se dan constantemente “in vivo”, ha permitido desarrollar diversos mecanismos de defensa antioxidante, como medios de protección. La enzima superóxido dismutasa remueve el O_2^- convirtiéndolo en H_2O_2 , el cual es transformado por la enzimas catalasa y Glutación peroxidasa, en agua (H_2O).⁽¹⁰⁾

Cuando la defensa antioxidante, no es cien por ciento eficiente, incrementa la formación de radicales libres en el organismo; a esto se denomina estrés oxidativo. Se cree que muchos de los efectos colaterales de los medicamentos se relacionan con un aumento en el daño oxidativo, causado por el exceso de radicales libres, los que producirían daño celular. Ante el estrés oxidativo, el organismo debe responder con una defensa antioxidante extra, ya que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula.⁽¹¹⁾

Figura 1. Desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo.⁽¹¹⁾





3.5.1. EQUILIBRIO ENTRE ESPECIES REACTIVAS Y MECANISMO ANTIOXIDANTE.

Los efectos dañinos de los radicales libres están controlados en el organismo humano mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobulina, hemopexina, ácido úrico, bilirrubina, albúmina) y exógeno a través de la dieta [vitaminas E y C, carotenoides, selenio y dentro del grupo de compuestos fenólicos (CF), se encuentran los ácidos fenólicos, fenoles no carboxílicos y flavonoides].⁽¹¹⁾

Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, pero otros como por ejemplo los CF pueden tener acciones combinadas. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos, formándose un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos. El grado de actividad de los CF y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula. Cabe destacar también que se ha descrito un sinergismo entre las distintas moléculas antioxidantes *in vitro*.⁽¹¹⁾

3.5.2. CLASIFICACION DE LOS ANTIOXIDANTES:

1) Según modo de acción:⁽¹¹⁾

Primario	Impiden la formación de radicales libres (quelantes de metales de transición).
Secundarios	Interrumpen la reacción de propagación por inactivación (como el alfa-tocoferol y el ácido ascórbico) o desplazan a las especies reactivas de oxígeno (como el ácido ascórbico, carotenoides, glutatión y la mayoría de las enzimas antioxidantes).
Terciarios	Reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado.



2) Según su origen:

Los antioxidantes se clasifican en ENDÓGENOS, fabricados por la propia célula, y EXÓGENOS, que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes:⁽¹²⁾

Exógenas	Endógenas	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cu
Vitamina C	Coenzima Q	Zn
Beta caroteno	Ácido tióctico	Mg
Flavonoides	Enzimas: Superóxido dismutasa(SOD) Catalasa Glutación peroxidasa.	Fe
Licopeno		Se

3.5.3. TIPOS DE ANTIOXIDANTES:

La superóxido dismutasa (SOD): es una enzima que cataliza la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno. Está presente en todas las células, con una concentración diferente en los distintos tejidos proporcional a la actividad metabólica de cada célula. En humanos existen tres formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo.⁽¹²⁾

Las mutaciones en la primera enzima SOD (SOD1) se han relacionado con la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y su sobreexpresión se ha relacionado con el Síndrome de Down. Los otras dos tipos de enzimas no se han relacionado con ninguna patología conocida, sin embargo en ratones la inactivación de SOD2 provoca la muerte perinatal y la inactivación de SOD1 causa hepatocarcinoma.⁽¹²⁾

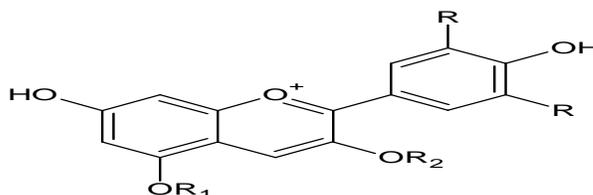
La catalasa: es una enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Se presenta en forma de hemotetrámero y se localiza en los peroxisomas.⁽¹²⁾



La glutatión peroxidasa (GP): es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua y alcohol, utilizando como agente reductor el glutatión reducido. Existen al menos 3 formas de GP seleno dependientes que difieren en su ubicación y en su especificidad de sustrato: una forma intracelular o celular, una extracelular o plasmática y otra con actividad específica para los fosfolipoperoxidos que, por lo general, está asociada a la membrana celular.⁽¹²⁾

En cuanto a los antioxidantes no endógenos, mientras las vitaminas actúan donando o aceptando electrones en las reacciones de óxido-reducción, los minerales regulan la actividad de las enzimas antioxidantes actuando como cofactores.⁽¹²⁾

La vitamina A: es un antioxidante soluble en la grasa que protege a las células contra radicales libres dañinos, además de otros roles vitales en el organismo. Sin embargo, a dosis muy elevadas es potencialmente peligrosa porque puede acumularse en cantidades tóxicas. Cuando existe una gran concentración de vitamina A en el organismo se la denomina Hipervitaminosis A. Esta situación puede traer aparejada complicaciones en la salud tales como: Vista borrosa, Ablandamiento de los huesos del cráneo sobre todo en niños y bebés, Visión doble (en niños), Anorexia, Fatiga, Dolor de cabeza, Osteoporosis, Cambios en el cabello y piel, Irritabilidad, hinchazón en las glándulas mamarias (en hombres), entre otros. Por esta razón se debe usar con precaución. En general, los suplementos de β caroteno, tomados en dosis nutricionales, son una forma segura de obtener la vitamina A. El β -caroteno, es llamado “pro vitamina A” y es transformado en vitamina A en la medida que el organismo lo necesite.⁽¹⁰⁾



Vitamina E: es un conjunto de compuestos fenólicos conocidos como tocoferoles y tocotrienoles. El alfa tocoferol es el más común y biológicamente el que tiene mayor acción vitamínica. Es un antioxidante lipofílico que se localiza en las membranas celulares, cuya



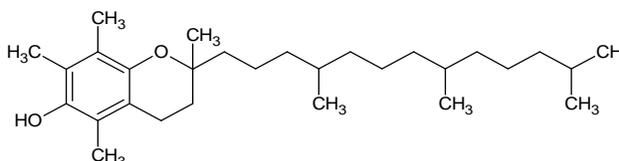
absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. Se considera el más importante protector de las moléculas lipídicas, ya que su acción consiste en proteger de la peroxidación a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular y también en inhibir la peroxidación de las LDL. Neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales libres hidróxilos, neutraliza peróxidos y captura anión superóxido para convertirlo en formas menos reactivas.⁽¹²⁾

Se ha propuesto que además de su función antioxidante puede desempeñar una función fisicoquímica específica en el ordenamiento de las membranas lipídicas, especialmente de los fosfolípidos ricos en ácido araquidónico (actúa así como estabilizador de membranas).⁽¹²⁾

La vitamina E es esencial para el hombre. Su deficiencia no es frecuente aun en personas que viven con dietas relativamente pobres de esta vitamina, pudiéndose desarrollar en casos de intensa malabsorción de las grasas, fibrosis quística, algunas formas de enfermedad crónica del hígado y abetalipoproteinemia congénita. El recién nacido, fundamentalmente el prematuro, es particularmente vulnerable a la deficiencia de vitamina E a causa de sus deficientes reservas corporales. La mayoría de las secuelas secundarias a la deficiencia de vitamina E son subclínicas. Se han descrito alteraciones neuropatológicas y miopáticas en pacientes en riesgo y las manifestaciones más frecuentes son diversos grados de arreflexia, trastornos de la marcha y de la propiocepción, disminución de las sensaciones vibratorias y oftalmoplejía.⁽¹²⁾

En cuanto a la relación de la deficiencia de vitamina E y el desarrollo de enfermedad cardiovascular y cáncer no hay resultados concluyentes hasta la fecha.⁽¹²⁾

Alfa tocoferol



La vitamina C o ácido ascórbico: es un importante antioxidante hidrosoluble que actúa potenciando el efecto de otros antioxidantes tal como sucede con la vitamina E y el selenio. No se sintetiza en el organismo, por lo que debe ser aportada por la dieta. Sus principales

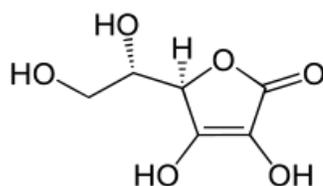


funciones son neutralizar el oxígeno singlete (O_2), capturar radicales hidróxilos y aniones superóxido y regenerar la forma oxidada de vitamina E una vez que ha reaccionado con un RL. Actúa de forma sinérgica con la vitamina E, y se ha comprobado que se absorbe mejor si se encuentra en una formulación que contenga vitamina E.⁽¹²⁾

Algunos estudios muestran una clara participación de la vitamina C como antioxidante sobre el endotelio vascular evitando la oxidación del óxido nítrico, potenciando su actividad y aumentando su síntesis. Otros estudios sugieren una disminución de la peroxidación lipídica en presencia de vitamina C. Por ambas razones parece demostrado su papel beneficioso en la aparición y progresión de la aterosclerosis.⁽¹²⁾

La principal consecuencia derivada del déficit de vitamina C es el escorbuto, raro en países occidentales en los que la dieta contiene la cantidad mínima necesaria de vitamina C para evitar la enfermedad. Se caracteriza por un defecto en la formación del colágeno, cuya consecuencia es la fragilidad capilar con las consiguientes petequias y gingivorragias, dolores generalizados, anemia multifactorial por la hemorragia, por disminución en la absorción de hierro y por déficit de folato.⁽¹²⁾

Hasta el momento, aunque es evidente su importante papel como potente antioxidante, los ensayos clínicos no aportan datos concluyentes para afirmar que la ingesta de cantidades elevadas de vitamina C aisladamente prevenga la aparición y desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas.⁽¹²⁾



El Beta caroteno: es precursor de la vitamina A, importante antioxidante lipofílico que neutraliza el oxígeno singlete. Su deficiencia puede provocar queratosis, ceguera nocturna, sequedad ocular y mancha de Bitot (depósitos blancos de epitelio queratinizado en la esclerótica), así como disminución de la resistencia a infecciones. Tiene la propiedad de capturar las ERO producidas en la piel por efecto de la radiación UV, por lo que es un componente habitual de cremas protectoras solares para prevenir fotodermatosis e incluso

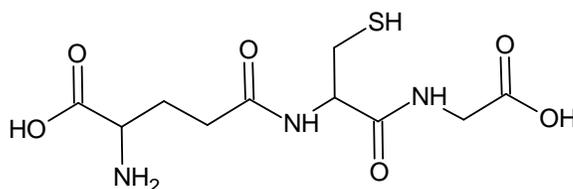


cáncer de piel. Además es capaz de regenerar la vitamina C una vez que ha reaccionado con un RL.⁽¹²⁾

Algunos estudios reflejan su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de las LDL, y otros afirman que es capaz de aumentar la cantidad de HDL. Por ambas acciones tendría un papel beneficioso actuando en la patogénesis de la aterosclerosis.⁽¹²⁾

La coenzima Q 10 (ubiquinona): es un potente antioxidante liposoluble presente en todas las células del cuerpo que procede de la dieta y también es sintetizado en el organismo a partir de tirosina, fenilalanina y Acetil CoA. Se encuentra en todas las membranas celulares, principalmente en la de la mitocondria, donde participa en la cadena de respiración aeróbica. Además potencia la respuesta del sistema inmune (su capacidad de producir anticuerpos), y como antioxidante es capaz de proteger el ADN de la acción de radicales libres y también de impedir la peroxidación lipídica.⁽¹²⁾

El glutatión: es el principal antioxidante hidrosoluble en el citoplasma de la célula. Es una proteína formada por tres aminoácidos: cisteína, glicina y ácido glutámico.⁽¹²⁾



Los oligoelementos **manganeso, cobre, selenio y zinc** actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes, pero también son capaces de ejercer funciones antioxidantes de manera independiente.⁽¹²⁾

La función del **zinc** en la regulación del estrés oxidativo se reconoció recientemente. Las NADPH oxidasas son un grupo de enzimas asociadas a la membrana plasmática que catalizan la producción de superóxido mediante el empleo de NADPH como electrón donante. El zinc es un inhibidor de esta enzima. La enzima superóxido dismutasa 1 y 3 contiene cobre y zinc. Se sabe que el zinc induce la producción de metalotioneína, que es muy rica en cisteína y es un excelente atrapador de radicales hidróxilo. Los iones de hierro



y cobre catalizan la producción de iones hidróxilo a partir del peróxido de hidrógeno. El zinc, al competir tanto con el hierro como con el cobre por la fijación a la membrana celular disminuye la producción de dichos radicales.⁽¹²⁾

El **selenio** aumenta la actividad de algunas enzimas antioxidantes (selenoenzimas), entre ellas la glutatión peroxidasa. Tiene un mecanismo de acción estrechamente relacionado con el de la vitamina E; de hecho los síndromes relacionados con la deficiencia de vitamina E y selenio pueden tratarse con cualquiera de estos dos elementos.⁽¹²⁾

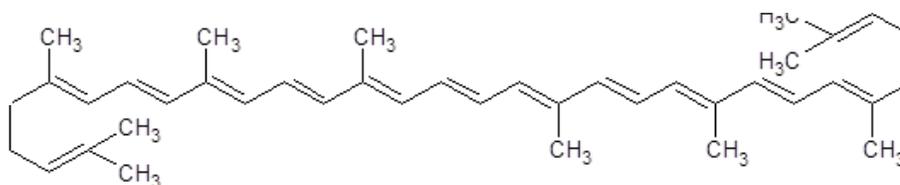
El **manganeso** forma parte de la estructura de la enzima superóxido dismutasa, protege contra la peroxidación lipídica, atrapa radicales hidróxilo y superóxido e induce la síntesis de metalotioneínas.⁽¹²⁾

El **hierro** y el **cobre** tienen importantes propiedades antioxidantes, pero también pueden actuar como importante fuente de producción de radicales libres, ya que en su forma reducida (Fe^{2+} y Cu^{+}) son muy reactivos (a diferencia de la forma oxidada Fe^{3+} y Cu^{2+}), descomponiendo el peróxido de hidrógeno en radical hidróxilo.⁽¹²⁾

Carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranyl-geranylpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno).⁽¹³⁾

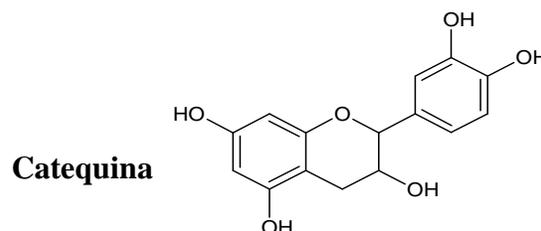
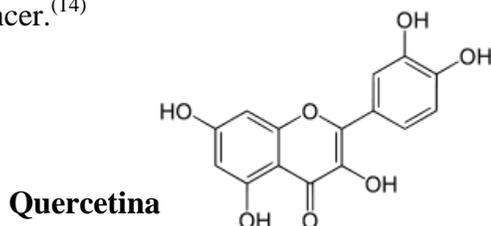
El **licopeno** posee propiedades antioxidantes, y actúa protegiendo a las células humanas del estrés oxidativo, producido por la acción de los radicales libres. Además, actúa modulando las moléculas responsables de la regulación del ciclo celular y produciendo una regresión de ciertas lesiones cancerosas.⁽¹²⁾

Licopeno



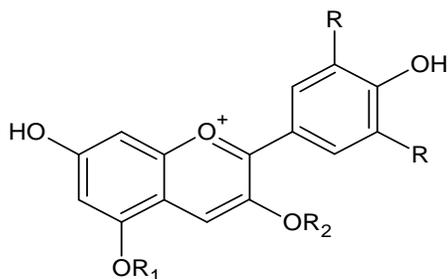
Los flavonoides: son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos.⁽¹³⁾

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.⁽¹⁴⁾



Antocianinas: Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico.⁽¹⁵⁾

El color entre violáceo y azulado de muchas bayas y frutas pequeñas se debe a sus antocianinas, un pigmento que las protege de la oxidación y que cumple funciones similares en el cuerpo humano. Se ha demostrado que las antocianinas, de la familia de los flavonoides, poseen una actividad antioxidante veinte veces mayor que la vitamina C y cincuenta veces superior a la de la vitamina E. Además, refuerzan las fibras de colágeno; neutralizan la acción de enzimas secretadas por los leucocitos en procesos inflamatorios o por los microbios en infecciones, y disminuyen la permeabilidad de los capilares.⁽¹⁶⁾



Estructura general de las antocianinas
 R_1 y R_2 pueden ser H en azúcares R
 pueden ser OH o H

3.5.4. PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes endógenos o exógenos pueden reducir la concentración de ROS, al inhibir o retrasar la oxidación de las sustancias, esto se puede llevar a cabo disminuyendo propiamente la concentración de los ROS o metales que catalizan la oxidación (Fe^{3+} , Cu^{2+} , etc.) o interferir con la cadena de reacciones que desencadenan la oxidación. También pueden actuar fortaleciendo el sistema de defensa antioxidante celular.⁽⁹⁾

Los antioxidantes se clasifican de la siguiente forma, de acuerdo a su mecanismo de acción:

- **Actividad antioxidante enzimática:** actúan específicamente sobre los ROS después de que se han formado y posteriormente los degradan: Ejemplo La eliminación catalítica de las ROS por enzimas peroxidasas como la superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas.⁽⁹⁾
- **Actividad antioxidante preventiva:** bloquean los promotores de secuenciación de la oxidación y la transición de metales como hierro y cobre.⁽⁹⁾
- **Actividad de inhibición o interrupción de la reacción antioxidante:** Interfieren en la reacción al ser oxidados antes que los radicales libres disminuyendo de esta forma la energía disponible para la reacción.⁽⁹⁾
- **Compactación de las ROS:** por agentes de bajo peso molecular (incluyendo glutatión, -cetoácidos, ácido lipoico y coenzima Q) o por moléculas obtenidas de la



dieta (vitaminas C y E). Protección de las biomoléculas por proteínas de choque térmico que actúan reparando o removiendo las proteínas dañadas.⁽⁹⁾

3.5.5. METODOLOGÍAS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para medir la inhibición de las ROS. Básicamente, se basan en la inhibición de estas especies por la presencia de compuestos antioxidantes.⁽⁹⁾

Entre los métodos se incluye la utilización de radicales coloreados como el radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS+) y el radical de 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH+) (Miller; Rice-Evans, 1997, Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).⁽⁹⁾

Debido al aumento en la demanda de información sobre la actividad antioxidante de las especies se requiere un método rápido y sensible.⁽⁹⁾

Método por TLC: consiste en la aplicación de la muestra, estándar antioxidante ácido gálico y ácido ascórbico (1 mg/mL) en una placa cromatografía de sílice gel 60F254 y dejarla correr en una solución saturada (acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua). Los extractos con actividad antioxidante presentan decoloración del DPPH en las bandas respectivas.⁽⁹⁾

Método colorimétrico con DPPH: es un radical libre utilizado para evaluar la actividad atrapadora de radicales de un compuesto o extracto vegetal (Ravishankara *et al.*, 2002). Se prepara una serie de tubos de reacción por ensayo, donde se coloca blanco del control y tampón de acetato (tubo 1), acetato y metanol (tubo 2), extracto de la muestra (tubo 3), tampón de acetato, metanol, extracto y solución de DPPH (tubo 4). Se incuba a temperatura ambiente por 30 min. Y posteriormente la absorbancia se lee en un espectrofotómetro (517 nm) contra el blanco de cada muestra. Se interpola el valor de CI50, que es la concentración del extracto requerida para disminuir un 50% la absorbancia de DPPH (Lima, 2003).⁽⁹⁾



Actividad reductora de Fe+3 a Fe+2: Se utiliza el método descrito por Oyaizu en 1986, donde al extracto se le adiciona amortiguador de fosfatos y ferrocianuro de potasio. La mezcla se incuba durante 20 min. a 50 °C y se le agrega ácido tricloroacético. Se centrifuga y separa el sobrenadante. Las lecturas de absorbancia se determinan a 700 nm (Duh *et al.*, 1997).⁽⁹⁾

Determinación de la actividad antioxidante en el sistema de emulsión del ácido linoléico: Se determina la actividad antioxidante como el grado de inhibición de la peroxidación del ácido linoléico. A una solución de dicho ácido y amortiguador de fosfatos se le agrega muestra de las especies vegetales en estudio. La mezcla es incubada a 40 °C y se mide en diferentes días el grado de oxidación. Los valores de absorbancia de la mezcla se leen a 500 nm para obtener el contenido de peroxidación. (Parras *et al.*, 2007).⁽⁹⁾

Determinación de los compuestos fenólicos: Las muestras se preparan agregando agua, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio (Na₂CO₃) y muestra. Se realiza la lectura espectrofotométrica de la absorbancias a 765 nm. Utilizando una curva patrón se calcula la concentración de compuestos fenólicos totales expresados como equivalentes de ácido gálico/g de peso seco (Lima, 2003).⁽⁹⁾

3.5.6. FACTORES QUE AFECTAN A LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS

Existen diferentes factores que afectan a la capacidad antioxidante de los extractos naturales, entre los que se puede citar la calidad de la planta original, origen geográfico, condiciones climáticas, época de recolección, almacenamiento y factores tecnológicos.⁽¹⁷⁾

➤ Variedad, planta y etapa de madurez.

El contenido total en polifenoles y la actividad antioxidante son diferentes para las diferentes partes (como hojas, corteza, corcho, aguja) de árboles (pino, abedul, abeto, álamo). Distintas fracciones de salvado de trigo presentan rendimientos de extracción y actividad antioxidante muy diferentes, sin embargo no hay muchas diferencias cuando se emplean variedades distintas. Es posible también encontrar diferencias en el contenido de



polifenoles entre hojas jóvenes y viejas de diversos materiales vegetales. También se han observado diferencias relacionadas con la etapa de maduración de la planta.⁽¹⁷⁾

➤ **Concentración del extracto**

La capacidad antioxidante depende de la concentración de extracto, como regla general un incremento en la actividad antioxidante está ligada a un aumento en la concentración de extracto, pero la concentración para la que se consigue un máximo de actividad antioxidante depende estrechamente del tipo de extracto y para el mismo extracto, del tipo de método utilizado para evaluar la capacidad antioxidante.⁽¹⁷⁾

➤ **Edad y condiciones de almacenamiento de los extractos.**

Los factores que afectan a la capacidad antioxidante de extractos durante su almacenamiento son la temperatura y la luz. Extractos de un mismo material presentan distinta estabilidad dependiendo del disolvente empleado para la extracción de compuestos polifenólicos, para subproductos de coco, extractos de metanol son estables a temperaturas de 50 °C en un intervalo de pH de 3 a 11, mientras que extractos de cloroformo y dicloroetano son menos estables (Azizah y col., 1999). Rodríguez de Sotillo y col. (1994b) encontraron que la concentración de polifenoles en la piel de patata no varía en procesos de autoclavado ni durante el almacenamiento a 25 °C, sin embargo cuando se exponen a la luz, el ácido clorogénico se degrada completamente en 7 días y se incrementa ligeramente en un 60 % del ácido clorogénico reduciéndose la concentración de ácido cafeico, que desaparece completamente después de 20 días. Estos extractos se mantuvieron estables por el periodo de 3 años conservados herméticamente cerrados en viales plásticos y a temperatura ambiente (23 °C).⁽¹⁷⁾

➤ **Efecto del disolvente.**

El tipo de aislado antioxidante obtenido, los rendimientos de extracción y la actividad antioxidante de los extractos dependen del tipo de disolvente utilizado, debido al diferente potencial antioxidante de compuestos con distinta polaridad.⁽¹⁷⁾



Los disolventes apolares son los más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos de medios acuosos. Se han empleado acetato de etilo y dietil-éter para la extracción de compuestos fenólicos de bajo peso molecular de madera de roble observándose que los compuestos polifenólicos extraídos con acetato de etilo a partir de diferentes sustratos naturales presentan una elevada capacidad antioxidante. Sin embargo, el etanol y el agua son los disolventes más frecuentemente utilizados por razones de ausencia de toxicidad y abundancia, respectivamente.⁽¹⁷⁾

➤ **Secado y temperatura.**

La temperatura durante el secado y la extracción afecta a la estabilidad de los compuestos fenólicos debido a la participación de reacciones de degradación química y enzimática, perdidas por volatilización o a descomposición térmica. Larrauri y col. (1997) encontraron que la temperatura es la variable más influyente sobre la alteración de los polifenoles. Algunos polifenoles aumentan su capacidad antioxidante mediante procesos de pirólisis suaves sobre los compuestos iniciales, especialmente en el caso del ácido cafeico. En procesos de extracción enzimáticos de pulpas de uvas, el uso de temperaturas moderadas a tiempos de operación largos conducen a la degradación de los compuestos fenólicos, mientras que en procesos de hidrólisis de duración entre 1-8 h no se observa degradación de estos compuestos.⁽¹⁷⁾

3.6. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN.

Extracción:

Es la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo. Al embeber la droga con el líquido de extracción se disuelven primero las sustancias a las que el disolvente puede llegar sin obstáculos. Al triturar la droga se destruyen varias células donde el grado de finura creciente favorece la disolución.⁽¹⁸⁾



El procedimiento químico clásico para obtener constituyentes orgánico a partir de tejidos de plantas (raíces, tallos, corteza, raíz, fruto etc.), es la extracción continua del material molido con una serie de solventes que pueden ser desde muy polares como el agua y etanol hasta menos polares como el éter y cloroformo.⁽¹⁸⁾

Preparación de extractos:

Los extractos de drogas, vegetales, pertenecen a las formas farmacéuticas más antiguas. La extracción propiamente dicha envuelve la separación de porciones biológicamente activas de los componentes inertes o inactivos, a partir de la utilización de un solvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado.⁽¹⁸⁾

En cada extracción se obtiene un complejo sistema de sustancias activas que puede contener sustancias lastres de diferente procedencia, por lo que son líquidos, semisólidos o polvos, relativamente impuros. Dependiendo del proceso utilizado y del grado de concentración de los extractivos, se encuentran preparaciones conocidas como: decocciones, infusiones, extractos fluidos, tinturas, extractos semisólidos y extractos en polvo.⁽¹⁸⁾

Métodos de extracción:

Los principales métodos de extracción son: Maceración, percolación, Digestión, Infusión, Decocción.⁽¹⁹⁾

La maceración: Es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (material vegetal) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer. La maceración se puede hacer en frío y con calor.⁽²⁰⁾

- a) **Maceración en frío:** Consiste en sumergir el producto a macerar en un líquido y dejarlo una determinada cantidad de tiempo, para transmitir al líquido características del producto macerado.⁽²⁰⁾



La ventaja de este método consiste en que al ser sólo con agua se logran extraer todas las propiedades de lo que se macera, es decir, toda su esencia sin alterarla en lo más mínimo.⁽²⁰⁾

- b) **Maceración con calor:** El proceso a ejecutar en este tipo de maceración es el mismo que en la maceración en frío, sólo que en este caso puede variar el medio por el cual se logra la maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso tomando como referencia que 3 meses de maceración en frío, es igual a 2 semanas en maceración con calor, esto es en el caso de las plantas y hierbas medicinales.⁽²⁰⁾

La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto a macerar, ya que siempre quema o destruye alguna pequeña parte de esta (muchas veces se trata de compuestos termolábiles).⁽²⁰⁾

La percolación: es el procedimiento más utilizado para la preparación de tinturas extractos fluidos.⁽¹⁹⁾

El **percolador** es un recipiente cónico con una abertura superior en la cual se puede colocar una tapa circular horadada que permite el paso del líquido y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él.⁽¹⁹⁾

Por la parte inferior posee un cierre regulable para permitir el paso del líquido a una velocidad conveniente.⁽¹⁹⁾

El material vegetal se humedece previo a su colocación en el **percolador** con una cantidad apropiada del menstuo colocado en un recipiente bien cerrado y se deja en reposo por espacio aproximado de cuatro horas.⁽¹⁹⁾

Pasado ese tiempo se empaqueta convenientemente en el **percolador** de manera que permita el paso uniforme del líquido y el total contacto de éste con el material vegetal. Se



llena de líquido y se tapa el **percolador**. Se abre la salida inferior hasta lograr un goteo uniforme y se cierra. Se adiciona más menstuo hasta lograr cubrir todo el material y se deja en maceración con el **percolador** cerrado por 24 horas.⁽¹⁹⁾

Pasado este tiempo se deja gotear lentamente y se adiciona suficiente menstuo hasta un volumen proporcional a las 3/4 partes del volumen total requerido para el producto final. Se presiona la masa húmeda residual para extraer el máximo del líquido retenido y se completa con suficiente menstuo hasta obtener la proporción adecuada, se filtra o se clarifica por decantación.⁽¹⁹⁾

La digestión: es una forma de maceración con ligero calentamiento durante el proceso de extracción, siempre que esta temperatura no altere los principios activos del material vegetal y así se logra una mayor eficiencia en la utilización del menstuo.⁽¹⁹⁾

Las temperaturas más utilizadas es entre 35° y 40° C., aunque puede elevarse a no más de 50° C. Se utiliza este proceso con aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles.⁽¹⁹⁾

Para ello se introducen las partes a extraer en un recipiente con el líquido previamente calentado a las temperaturas indicadas; se mantiene durante un periodo que puede oscilar entre media hora y 24 horas, agitando el envase regularmente.⁽¹⁹⁾

La infusión: es una solución diluida de constituyentes fácilmente soluble de la droga cruda. Es adecuada para las drogas aromáticas, para evitar que los aceites volátiles se evaporen a tras temperaturas.⁽¹⁹⁾

La infusión se realiza sumergiendo las partes a utilizar de la planta en una cantidad de agua hirviendo, se deja reposar unos 15 minutos y se filtra a continuación mediante un tamiz o papel de filtro.⁽¹⁹⁾



La decocción se usa para principios activos que no sufran alteraciones con la temperatura.⁽¹⁹⁾

En este procedimiento se hierve la droga en agua por espacio de 15 a 60 minutos (según sea la planta o el principio activo a extraer), se enfría, se cuela y se añade suficiente agua fría a través de la droga hasta obtener el volumen deseado.⁽¹⁹⁾

Dependiendo de la consistencia de las partes a extraer, se darán tiempos de decocción más o menos largos; generalmente, las raíces, hojas, flores y pedúnculos foliados se hierven en agua durante unos 15 minutos, mientras que las ramas y otras partes más duras pueden precisar hasta una hora, tiempo durante el cual deberá ir reponiéndose el agua evaporada.⁽¹⁸⁾

Una vez hecha la decocción hay que filtrar el líquido mediante un paño, exprimiendo bien el líquido obtenido.⁽¹⁹⁾



4. MATERIAL Y MÉTODO.

TIPO DE ESTUDIO: Es un estudio experimental realizado en el Período de Mayo-Octubre 2012.

ÁREA DE ESTUDIO: El área de estudio, es el Departamento de Farmacia Industrial, en el Área de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas.

UNIVERSO: El universo de estudio son todas las especies que forman parte de la familia Arecaceae.bv

MUESTRA: *Cocos nucifera* perteneciente a familia Arecaceae. (Única especie).

UNIDAD DE ANÁLISIS: Fruto tierno del coco perteneciente a la especie *Cocos nucifera*.

TIPO DE MUESTREO: Muestreo aleatorio simple.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterio de inclusión:

- Frutos cocos nucifera pertenecientes a la variedad de amarillo de malasia.
- Frutos del coco nucifera con medidas no mayores de 5 cm en longitud y 10 cm de espesor.
- Frutos del cocos nucifera cultivado en la ciudad de león

Criterio de exclusión:

- Frutos cocos nucifera que no pertenecen a la variedad de amarillo de malasia.
- Frutos del cocos nucifera que estén fuera de los tamaños de 3 cm a 5 cm de y con una longitud entre 8.5 cm a 9 cm.
- Frutos del coco nucifera cultivado en otra ciudad que no sea el municipio de león.

**Variables en estudio.**

- ❖ Extracción de componentes fitoquímicos del *Cocos nucifera*.
- ❖ Actividad antioxidante.
- ❖ Inhibición del radical DPPH.

4.1. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.

Variable	Definición	Indicador
Extracción de fitoquímicos	Es la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo.	Producto líquido que contiene los componentes Fitoquímico
Actividad antioxidante	Capacidad de una molécula de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.	Cambio de coloración de la solución del radical DPPH.
Inhibición	Medida en que el antioxidante captura radicales libres.	Porcentajes

4.2. PARTE EXPERIMENTAL:**Equipo utilizado:**

- ❖ Espectrofotómetro uv-vis.
- ❖ Balanza analítica.
- ❖ Mufla eléctrica.
- ❖ Bomba de succión.

**Cristalería:**

- ❖ Balones aforados 100 ml, 25 ml.
- ❖ Beakers pírex 250 ml, 100 ml.
- ❖ Probeta pírex 100 ml.
- ❖ Espátula.
- ❖ Pipetas serológicas 10 ml, 1 ml.
- ❖ Embudos de vidrios.
- ❖ Capsulas de porcelana.

Reactivos y solventes:

- ❖ DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).
- ❖ Dimetil-sulfóxido.
- ❖ Vitamina C o ácido ascórbico.
- ❖ Alcohol etílico.

4.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN.

En la preparación de los extractos de la especie en estudio realizaron extracciones del material vegetal fresco y seco, de los dos tamaños del fruto seleccionados para el estudio.

Procedimiento:**Fruto fresco.**

- Pesar 200g del material vegetal fresco previamente cortado de cada tamaño de la muestra.
- Colocar cada material vegetal pesado en botellas desechables de 500 ml.
- Adicionar a las muestras 300 ml de alcohol etílico puro.



- Dejar macerando el material vegetal por 5 días a temperatura ambiente.
- Filtrar los extractos y exprimir los residuos.
- Depositar los filtrados en recipientes color ámbar.

Fruto seco.

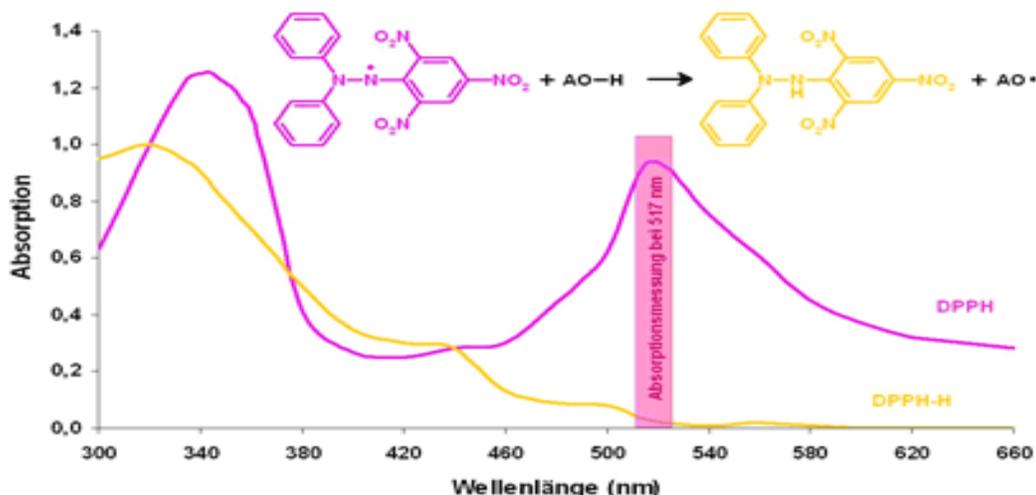
Las muestras del material vegetal del fruto pequeño fueron secadas a una temperatura de 45 ± 5 °C, bajo presión reducida 20 ± 5 °C.

- Pesar 103 g del material vegetal previamente seco y cortado de cada tamaño de la muestra.
- Colocar cada material vegetal pesado en botellas desechables de 500 ml.
- Adicionar a las muestra 130 ml de alcohol etílico puro.
- Dejar macerando el material vegetal por 5 días a temperatura ambiente.
- Filtrar los extractos y exprimir los residuos.
- Depositar el filtrado en recipientes color ámbar.

4.4. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Determinación de la Actividad antioxidante por el método DPPH:

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Willam, DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 515 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.



Preparación del Reactivo de DPPH:

Pesar aproximadamente 0.014234 g del reactivo DPPH, colocarlo en un balón de 100 ml y se llevar a afore con Etanol (EtoH), como diluyente.

Preparación del Ácido Ascórbico (Vitamina C)

Pesar 0.1 g de Ácido Ascórbico y llevar a un balón de 100 ml y luego se aforar con etanol.

Preparación de la muestra

Lavar y limpiar las cápsulas con alcohol para evitar cualquier contaminación de la muestra y posteriormente secar las cápsulas con la ayuda de una cocina eléctrica a temperaturas elevada aproximadamente a 800 °C para evitar humedad. Una vez secas esperar 30 minutos a que se enfríen las capsulas a temperatura ambiente para luego proceder a pesar y anotar su peso. Una vez pesadas adicionar 600 a 2000 mcl de extractos, dejarlos reposar 24 horas para secar el extracto a temperatura ambiente, una vez secos pesar las cápsulas nuevamente con el extracto seco. Proceder a realizar la diferencia de la cápsula llena y cápsula vacía para saber cuánto es la cantidad de extracto seco que se obtuvo.

Realizar cálculos para saber cuánto se le añadirá de DMSO5% para diluir el extracto seco. También realizar cálculos para determinar cuánta es la cantidad de extracto a añadir a cada



celda para contener una concentración de 4 mg del activo y luego completar con el reactivo de DPPH para llegar a 3500 mcl.

Preparación del patrón positivo

En celdas desechables con una capacidad de 4000 mcl adicionar 200 mcl ácido ascórbico (Vit. C) disuelto en etanol preparado anteriormente. Seguidamente adicionar 200 mcl de dimetil sulfato (DMSO) completando con 3600 mcl de DPPH.

Preparación del patrón negativo

Adicionar a la celda 200 mcl de dimetil sulfoxido (DMSO) seguidamente agregar 3800 mcl de DPPH.

Preparación del Blanco:

Agregar en una celda 200 mcl de Dimetil-sulfoxido (DMSO) + 3800 mcl de Etanol.

Medidas de absorbancias:

A los extractos obtenidos se les realizó el bioensayo de captura de radicales libres DPPH (1,1Diphenyl -2- picrylhydrazyl) se les medirá las absorbancias a 515 nm (luz visible) utilizando el espectrofotómetro.

El reactivo tiene color violeta, la actividad atrapadora de radicales libre se hace evidente cuando la solución se decolora. El % inhibición se calculo con la siguiente fórmula:

$$\%Inhibicion \left(- \left(\frac{abs. Muetsra}{abs.patron} \right) \right) + 1 * 100$$

Todos los cálculos se realizaron en hoja de cálculo de Excel utilizando la fórmula anterior.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se logro verificar la actividad antioxidantes de los extractos etanolitos, ya que se observo que la soluciones DPPH color azul-violeta, se decoloraban hacia un amarillo pálido por acción de los extractos alcohólicos obtenidos a partir del fruto del cocos nucifera, poniendo en evidencia la capacidad captaradora de los extractos.

Tabla No 1: Capacidad antioxidante de los diferentes extractos etanolicos del Cocos nucifera.

Muestra	% Inhibición del Radical DPPH
Vitamina C	95,81
Fruto fresco pequeño	85,58
Fruto fresco grande	88,06
Fruto seco pequeño (Menos 34% H ₂ O)	90,18
Fruto seco grande (Menos 30% H ₂ O)	93,14

La tabla N^o 1: Muestra los porcentajes de inhibición del radical DPPH obtenidos de los diferentes extractos etanolicos del Cocos nucifera a concentración estándar de mg/ml por extracto. Así mismo se puede observar la capacidad antioxidante de la vitamina C, utilizada como patrón positivo.

Los resultados de actividad antioxidante mostraron que los extractos poseen un marcado potencial antioxidante. Siendo los extractos del fruto seco, tanto el pequeño como el grande los que mostraron mayores porcentajes de inhibición con valores de 90.18% y 93.14 respectivamente, en comparación a los extracto del fruto fresco con 85.58% y 88.06% respectivamente. Esta diferencia de capacidad captadora del DPPH entre los extractos se debe que el material vegetal seco permite preservar los activos del fruto, ya que al quitar la humedad previene la acciones enzimática, se asegura la fijación de los constituyentes en el material vegetal y conservación de la actividad. También se demuestra que aun mayor tamaño del fruto este presento una mayor capacidad antioxidante, esto puede deberse a las variaciones en el contenido de activos debido a las etapas del crecimiento vegetativo que se encuentra la planta.



Grafico No 1:

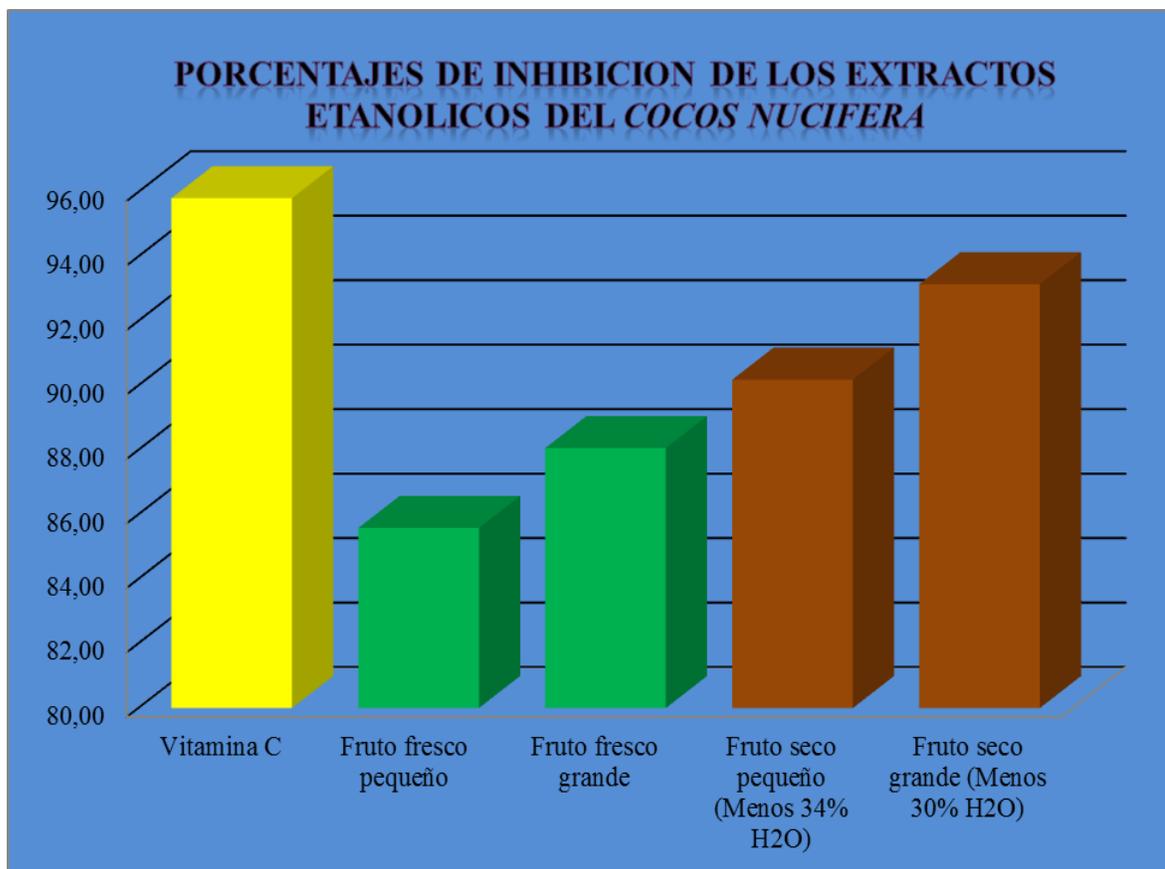
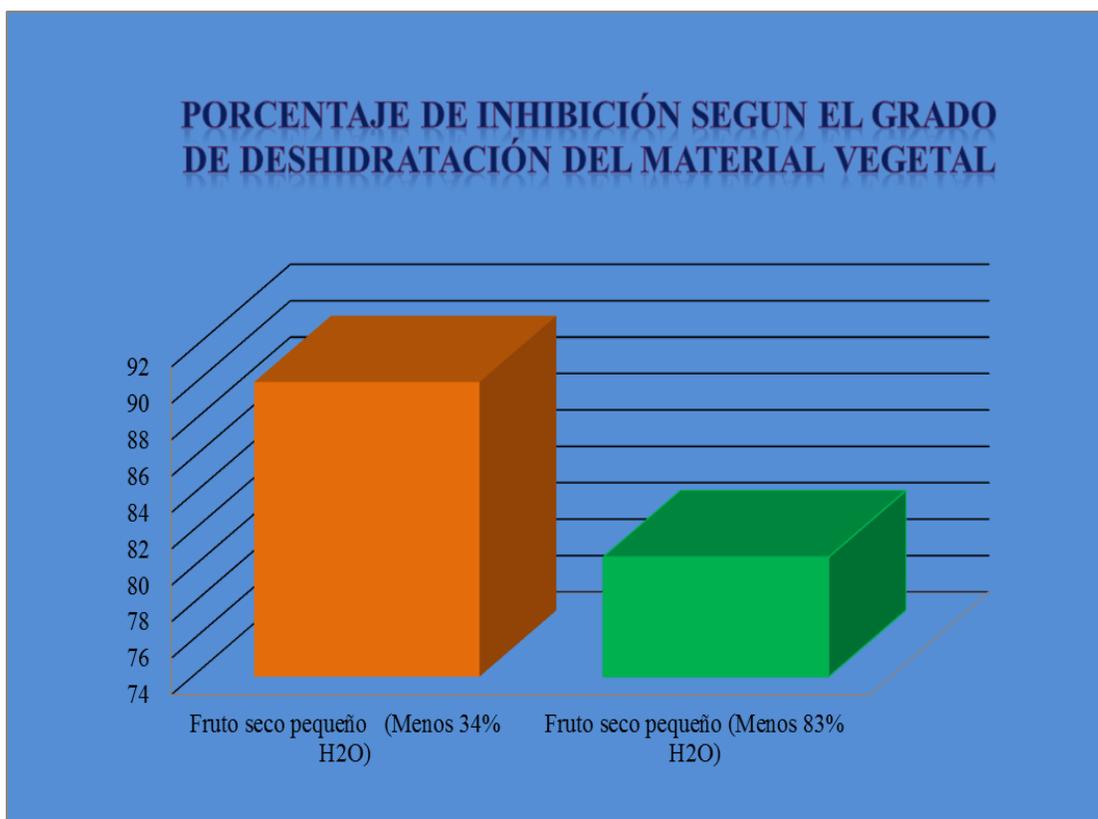


Tabla No 2: Capacidad antioxidante según grado de secado del fruto pequeño.

Muestra	% Inhibición del Radical DPPH
Fruto seco pequeño (Menos 34% H ₂ O)	90
Fruto seco pequeño (Menos 83% H ₂ O)	80,57

Esta tabla muestra que el fruto seco con 34% de pérdida de agua muestra mayor capacidad antioxidante, con un 90% de inhibición del radical DPPH. Estos resultados pueden deberse al efecto de la temperatura sobre el material vegetal durante el secado, ya que para perder mayor humedad la muestra tuvo que estar un mayor tiempo expuesta a la temperatura (45 ± 5 °C). La temperatura es un factor que durante el secado y la extracción afecta a la estabilidad de los compuestos activos (polifenoles) debido a la participación de reacciones de degradación química, volatilización, o descomposición térmica. Por lo tanto el éxito del secado depende de dos principios fundamentales: el control de la temperatura, y el flujo de aire.

GRAFICO No 2



6. CONCLUSIONES:

- Se logró verificar la actividad antioxidantes de los extractos, por decoloración de la solución de DPPH de Azul- violeta a amarillo pálido.
- Los diferentes extractos del fruto del Cocos nucifera, presentaron una buena actividad antioxidante, siendo el extracto etanólico del fruto seco, el que presentó una mayor capacidad de captación del radical DPPH, ya que la eliminación de humedad en el material vegetal previene la acciones enzimática, se asegura la fijación de los constituyentes en el material vegetal y conservación de la actividad.



7. RECOMENDACIONES:

- Es recomendable seguir realizando estudios adicionales por medio de otros métodos que permitan evaluar la capacidad antioxidante.
- La realización de Scrinning fitoquímicos que permita el aislamiento e identificación de los principios activos presentes en los extractos estudiados en el presente trabajo, ya que han presentado una gran capacidad antioxidante.
- Se recomienda también mantener almacenado la solución de DPPH, evitando la exposición a la luz, ya que esta afecta a su estabilidad.
- En el proceso de secado del material vegetal se recomienda mantener un control de la temperatura y del flujo de aire, que permita la conservación y estabilidad de los activos.



8. BIBLIOGRAFIA

1. Instituto de Nutrición y Tecnología de alimentos (INTA), (n.d.). Recuperado el 04 de septiembre, 2012 de <http://portalantioxidantes.com/antioxidantes/>
2. Pareja, S. Carrascal, M. y Díaz, F. (2010). Evaluación de la Capacidad Antioxidante de 36 Extractos Etanólicos Totales de Frutos y Semillas de 36 Plantas de la Región Caribe Colombia. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. ISBN: 978-958-9230-59-6. Recuperado de: <http://190.27.248.91/redunicar/encuentros/5encuentro/ponencias/028.pdf>
3. *Cocos Nucifera*. (n.d.). En Wikipedia. Recuperado el 04 de septiembre, 2012 de http://es.wikipedia.org/wiki/Cocos_nucifera.
4. Las Palmeras. El Cocotero. (n.d.). Recuperado el 04 de septiembre, 2012 de http://www.dipbot.unict.it/palme_es/descr01.html
5. Cultura Agraria. Palma de Coco o Cocotero. (n.d.). Recuperado el 04 de septiembre, 2012 de <http://culturaagraria.blogspot.com/2012/03/palma-de-coco-o-cocotero-cocos-nucifera.html>.
6. Coco. (n.d.). En Wikipedia. Recuperado el 05 de septiembre, 2012 de <http://es.wikipedia.org/wiki/Coco>.
7. Infojarfin. Coco, Cocos, Cocotero, Palma de coco. (n.d.). Recuperado el 05 de septiembre, 2012 de <http://articulos.infojardin.com/Frutales/fichas/coco-cocos-cocotero-cocoter.htm>
8. Radical. (n.d.). En Wikipedia. Recuperado el 06 de septiembre, 2012 de [http://es.wikipedia.org/wiki/Radical_\(qu%C3%ADmica\)#Tipos_de_radicales](http://es.wikipedia.org/wiki/Radical_(qu%C3%ADmica)#Tipos_de_radicales)
9. Gaitán, I. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de 5 especies vegetales Utilizadas popularmente para el tratamiento de afección de la memoria y los



- nervios. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2882.pdf
10. Castañeda, C. Ramos, E. y Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Medico*. Vol. 8, N°1 Julio 2008. Pág., 57-59. Recuperado de: http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf.
11. Covas M. y Botet J. (2003). Efectos Antioxidantes del Aceite de Oliva y de sus Compuestos fenólicos. Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Programa de Doctorado en la. Pág.5-7. Recuperado de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4431/mfc1de1.pdf;jsessionid=6A145C0E32211D2F63D27ADD0A3B086D.tdx2?sequence=1>
12. Dasbrowska M. y Moya M. (2009). Vitaminas y antioxidantes. Servicio de medicina interna y urgencias. Hospital. Puerta de Hierro- Majadahonda. Madrid. Departamento de medicina de la universidad autónoma de Madrid. Pág.11-16. Recuperado de: http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf?botsearch
13. Martínez, A. (2001). Carotenoides. Facultad de Ciencias químicas. Pág.2. Recuperado de: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/carotenoides2001.pdf>
14. Martínez, S. González, J. y Tuñón, M. (2002). Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. ISSN 0212-1611. Pág. 271-272. Recuperado de: http://www.recursosdeenologia.com/docs/2002/2002_los_flavonoides_propiedades_y_acciones_antioxidantes.pdf
15. Ortiz, M. Reza, M. Chew, R. y Meza, J. (2010). Propiedades Funcionales de las Antocianinas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n. Fracc. Filadelfia. 35010. Gómez Palacio, Durango, México. Pág. 16. Recuperado de: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-06.pdf>



-
16. Antocianinas Antioxidantes. Revista Cuerpo Mente (n.d.) Recuperado el 08 de septiembre, 2012 de <http://www.cuerpomente.es/aliado.jsp?ID=29646>.
 17. Conde, E. (2009). Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. Departamento de Ingeniería Química Facultad de Ciencias de Ourense. Universidad de VIGO. Recuperado de: http://igc.xunta.es/pls/portal/docs/PAGE/IGC/012_CENTRODEDOCUMENTACION_MENU/004_ESTUDOS_MENU/ENMA%20CONDE%20PI%D1EIRO.PDF
 18. Espinoza, J. Lopez, A. y Espinosa, M. (2010) Determinar los Constituyentes Químicos en la Hoja de la Cissus verticillata L. por Medio de un Screening Fitoquímico. Pág. 17-18
 19. Temas de farmacognosia. Métodos de Extracción. (n.d.). Recuperado el 10 de septiembre del 2012 de <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/m%C3%A9todos-de-extracci%C3%B3n/decocci%C3%B3n/>.
 20. Maceración. (n.d.) Wikipedia. Recuperado el 10 de septiembre del 2012 de <http://es.wikipedia.org/wiki/Maceraci%C3%B3n>.

9. ANEXOS

1. Material vegetal



2. Material vegetal en proceso de corte



3. Clasificación de cada muestra previamente cortada según tamaño



4. Proceso de secado



5. Extractos preparados (Maceración por 7 días)



6. Filtración de extractos.



7. Preparación de muestras para el análisis.



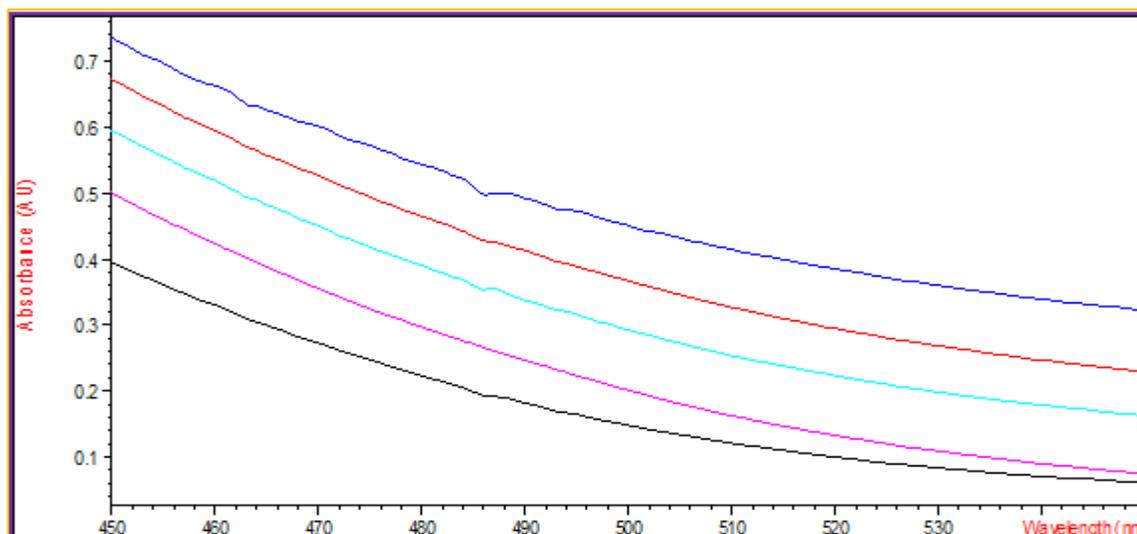
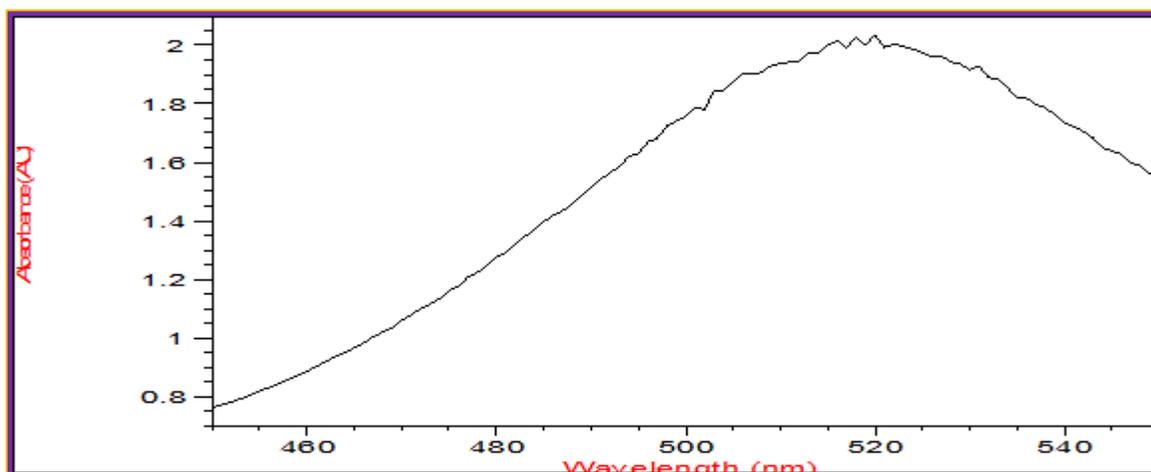


Primeras lecturas de capacidad captadora Del radical DPPH.

Fruto seco pequeño (Menos 34% H₂O)

Fruto seco grande (Menos 30% H₂O)

Nombre del Standard	DPPH(mcg)	Abs<515nm>	%Error	
DPPH	142	1.9986	0.00	
Muestra	Dilut. Factor	dpph(mcg)	Abs<515nm>	%Inhibición
Vitamina C	100000	7.821	0.11007	94.49
Fruto fresco pequeño	100000	28.351	0.39902	80.04
Fruto fresco grande	100000	21.999	0.30962	84.51
Fruto seco pequeño	100000	16.889	0.23771	88.11
Fruto seco grande	100000	10.426	0.14674	92.66

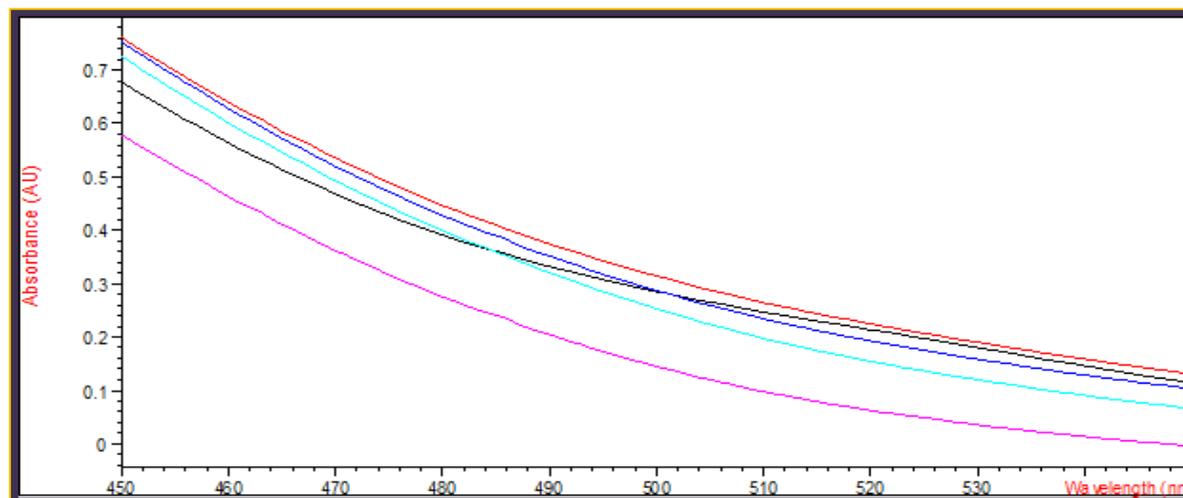
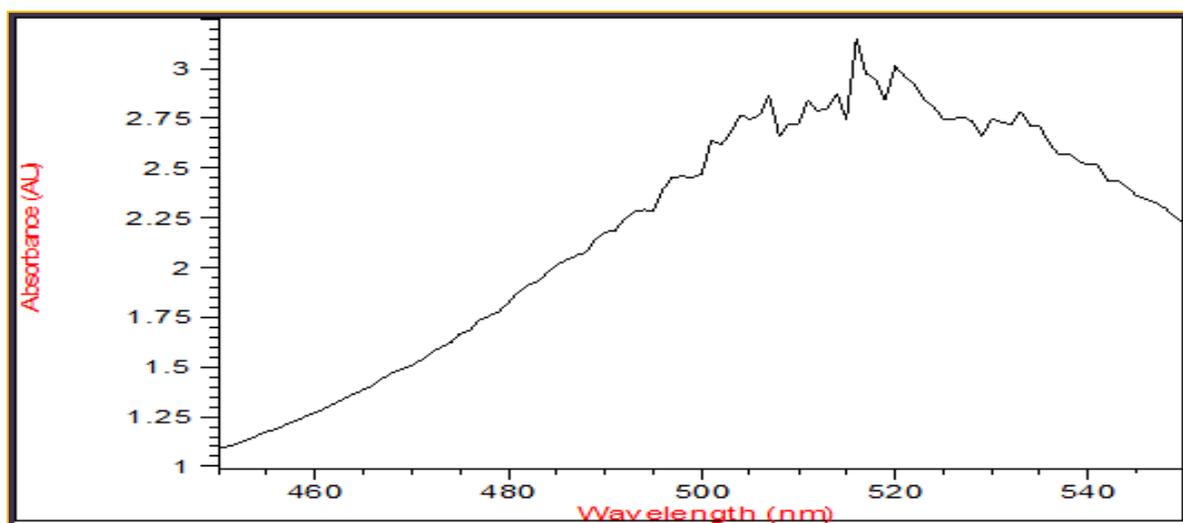


Segunda lectura de lá capacidad captadora del radical DPPH

Fruto seco pequeño (Menos 34% H₂O)

Fruto seco grande (Menos 30% H₂O)

Nombre del Standard	DPPH (mcg)	Abs<515nm>	%Error	
DPPH	148	2,7436	0.00	
Muestras	Diluí. Factor	DPPH (mcg)	Abs<515nm>	%Inhibición
Vitamina C	100000	4.2521	0.07882	97.13
Fruto fresco pequeño	100000	13.134	0.24347	91.13
Fruto fresco grande	100000	12.408	0.23002	91.62
Fruto seco pequeño	100000	11.459	0.21242	92.26
Fruto seco grande	100000	9.4336	0.17488	93.63



Lecturas de capacidad captadora del radical DPPH (Menos 80% H₂O)

Nombre del Standard	DPPH (mcg)	Abs<515nm>	%Error	
DPPH	144	3.6108	0.00	
Muestras	Dilut. Factor	DPPH (mcg)	Abs<515nm>	%Inhibición
Vitamina C	100000	7.636	0.19148	94.70
Fruto seco pequeño	100000	19.916	0.49939	86.17
Fruto seco pequeño	100000	30.598	0.76726	78.75
Fruto seco pequeño	100000	33.436	0.83842	76.78

