

Inhibición de la polifenoloxidasas extraída del banano (*cavendish*) por medio de algunos derivados del isoespintanol

Maritza Andrea Gil Garzón*

Benjamín A. Rojano**

Carlos Andrés Guerrero*

Resumen

Introducción. Buscando nuevas fuentes de compuestos naturales que contengan actividad antioxidante, se ha encontrado una amplia variedad de plantas fenólicas con alto poder protector sobre la inhibición del pardeamiento enzimático responsable de cambios de color indeseables en frutas y vegetales frescos. **Objetivo.** En este trabajo, se estudió la inhibición del pardeamiento enzimático de la polifenol oxidasa, PPO, extraída del banano Cavendish Gigante (tipo exportación), utilizando como sustrato dopamina. **Metodología.** Como inhibidores se utilizaron: el isoespintanol, metabolito extraído de la planta *Oxandra cf. xylopioides* (*Annonaceae*) y dos de sus análogos: 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol y 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno que fueron obtenidos simultáneamente por el método de bromación con bromuro de dimetilsulfonio, en una relación (75:25), respectivamente. Además, se utilizó el ácido ascórbico como antioxidante de referencia. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética, RMN y cromatografía acoplada a masas, GC-MS y su capacidad antioxidante fue

* Corporación Universitaria Lasallista

** Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

evaluada por los métodos de ABTS, FRAP y DPPH. La actividad de la PPO parcialmente purificada, fue analizada sobre el extracto enzimático, espectrofotométricamente a 30°C en presencia de los antioxidantes a 500, 1000 y 1500 ppm. **Resultados y análisis.** El isoespintanol presentó la mejor respuesta por las tres técnicas de capacidad antioxidante, mientras el bromado presentó la mejor capacidad reductora por la técnica FRAP y el demetilado tuvo un mejor comportamiento en medio metanólico (DPPH). La actividad de la PPO fue 102.93 unidades de actividad; esto significa que hubo una reducción entre un 72.5 y 92% con todos los compuestos. La mayor inhibición se logró a 1500 ppm de ácido ascórbico (92%). Con la inhibición de la actividad enzimática para el compuesto bromado y demetilado no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a 500 ppm (84.8 – 84.53%), 1000 ppm (73.87 - 72.53%) y 1500 ppm (84 – 82.4%), respectivamente. Lo contrario ocurrió para el isoespintanol con respecto a sus dos análogos, a 1000 ppm (42.4%), que evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$).

El tipo de inhibición fue estudiada para el isoespintanol que presentó una inhibición competitiva ($K_i = 0.015M$ y $K_M = 0.026M$).

Palabras clave: PPO, Isoespintanol, pardeamiento enzimático, DPPH, FRAP, ABTS.

Inhibition of polyphenoloxidase from bananas (*cavendish*) by the use of some isoespintanol derivatives

Abstract

Introduction. Looking for new sources of natural compounds with anti-oxidant activity, a great variety of phenolic plants have been being found. They have a high protective power on the enzymatic browning, responsible for undesired color changes in fresh fruits and vegetables.

Objective. In this work, enzymatic browning inhibition of polyphenol oxidase, PPO, extracted from Giant Cavendish bananas (export type) is studied, by the use of the dopamine substratum. **Methodology.** The inhibitors used were: Isoespintanol (a metabolite extracted from *Oxandra cf. xylopioides* (Annonaceae) and two of its analogs: 2-isopropyl-4-bromo-3,6-dimethoxy-5-methylphenol and 3-isopropyl-6-methyl-1,2,4-trihydroxybenzene, which were simultaneously obtained by the use of the bromination method with dimethylsulphonium bromide in a (75:25) relation, respectively. Also, ascorbic acid was used as a reference anti-oxidant. The compounds synthesized were characterized by

performing a magnetic resonance spectroscopy and a chromatography coupled to masses and its anti-oxidant capability was evaluated with the ABTS, FRAP and DPPH methods. PPO's activity, partially purified, was analyzed on the enzymatic extract, spectrophotometrically, at 30°C before the anti-oxidants at 500, 1000 and 1500 ppm. **Results and analysis.** Isoespintanol had the best response under the three anti-oxidant capability techniques, while the bromination had the best reduction capability under the FRAP method and the demethylated had a better performance in the methanolic medium. PPO's activity was 102.3 activity units, this means that there was a reduction between 72.5 and 92% with all of the compounds. The highest inhibition was achieved at 1500 ppm of ascorbic acid (92%). With the inhibition of the enzymatic activity for the brominated and the demethylated compound there were no significant differences, ($P>0.05$) at 500 ppm (84.8 – 84.53%), 1000 ppm (73.87 - 72.53%) and 1500 ppm (84 – 82.4%), respectively. The opposite took place for the isoespintanol concerning its two analogs, at 1000 ppm (42.4%), which obtained significant statistical differences ($P>0.05$). The inhibition type was studied for isoespintanol, which had a competitive inhibition ($KI=0.015M$ y $KM=0.026M$).

Key words: PPO, Isoespintanol, enzymatic browning, DPPH, FRAP, ABTS.

Introducción

El color en los alimentos es un parámetro de gran importancia para el consumidor. Al menos cinco causas han sido detectadas como responsables del cambio de color en frutas y vegetales frescos: pardeamiento u oxidación enzimática de polifenoles, reacciones de Maillard, oxidación de ácido ascórbico, caramelización y formación de polímeros oscurecidos por la acción oxidativa de lípidos¹⁻⁴. Estas reacciones ocurren cerca del esquema de proceso del consumidor, como el almacenamiento y exhibición; por tal razón, el control debe ser realizado desde la recolección hasta el consumidor para minimizar pérdidas y sostener el valor económico para el agricultor y el procesador. Se han comprobado pérdidas que sobrepasan el 50% en frutas exóticas y vegetales, en particular variedades tropicales y subtropicales⁵.

Las enzimas que catalizan el pardeamiento pertenecen a las óxido-reductasas, y se conocen con diferentes nombres: monofenol oxidasa, tirosinasa y fenolasa; esta última es la más aceptada y cuyo nombre corresponde a la *o*-difenoil-oxígeno-óxido-reductasa (E.C. 1.14.18.1 usualmente llamada, PPO)^{6,7}. La PPO cataliza el paso inicial de la oxidación de *o*-fenoles a *o*-quinonas, los cuales sufrirán más adelante polimerización para producir pigmentos insolubles y oscuros reconocidos como melaninas responsables del color⁸⁻¹¹. El pardeamiento enzimático también está involucrado con la pérdida en el valor nutricional debido a la oxidación del ácido ascórbico^{12,13}.

En la industria de alimentos, la actividad de la PPO puede ser evitada usando tratamientos térmicos¹⁴, pero el calor puede causar características no deseables¹⁵ especialmente en vegetales y frutas frescas¹⁶. Otras alternativas para la inhibición de la actividad han sido propuestas: aditivos químicos como bisulfitos¹⁷⁻¹⁹, ácido ascórbico y sus análogos²⁰⁻²² y cisteína como agente reductor de quinonas a difenoles²³⁻²⁵. Además, puede ser inhibida por varias técnicas basadas en la eliminación de uno o más componentes esenciales como oxígeno y Cu²⁺, cambios del sustrato^{26,27}. Así, los inhibidores de pardeamiento pueden ser clasificados según su modo de acción en seis categorías: agente reductores, quelantes y acomplejantes, inhibidores de enzimas, tratamientos enzimáticos²⁸ y atrapadores de oxígeno singulete²⁹.

El control del pardeamiento es un reto en la industria de frutas y vegetales. Actualmente, los productores de alimentos prefieren aditivos naturales especialmente agentes antioxidantes libres de sulfitos, debido al peligro que representan para la salud humana, especialmente en pacientes asmáticos³⁰. De esta forma, hay una tendencia de crecimiento en el reemplazo de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales que no produzcan efectos tóxicos³¹. En los últimos años, los compuestos fenólicos de origen vegetal han sido objeto de estudio³²⁻³⁵ y se ha identificado un gran número de sustancias con amplio espectro de actividades funcionales, principalmente por su potencial benéfico para la salud debido a su actividad antioxidante³⁶, por la presencia de algunos de sus productos de degradación que son multifuncionales y pueden actuar como agentes reductores, reaccionantes con radicales libres, quelantes y acciones antimicrobianas^{37,38,39} que los convierte en una nueva alternativa antioxidante.

En la planta *Oxandra* cf. *xylopioides* (*Annonaceae*) se encuentran como metabolitos principales el berenjenol y el isoespintanol (0.1 y 1.5 % en

base seca respectivamente) los cuales poseen actividad anti-inflamatoria⁴⁰. Además, se ha estudiado el efecto protector del isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol), sobre el ADN de linfocitos humanos, y comparado con el BHA como antioxidante de referencia, muestra un gran efecto a un bajo rango de concentraciones (3-80 mM)⁴¹. Por la anterior razón, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de la inhibición del pardeamiento enzimático en el extracto parcialmente purificado del banano usando isoespintanol y dos de sus análogos, y compararlos, además, con el ácido ascórbico que en anteriores estudios presentó inhibición total sobre la pulpa de banano⁴².

Marco teórico

Las reacciones de óxido-reducción son comunes en los sistemas biológicos y también en los alimentos. Algunas de estas reacciones son beneficiosas para los alimentos, pero otras son perjudiciales como ocurre con la degradación oxidativa de las vitaminas, pigmentos y lípidos que producen la pérdida del valor nutricional, el desarrollo de malos olores y color desagradable. La oxidación se produce cuando un átomo o grupo de átomos ceden electrones. De forma simultánea, se produce la correspondiente reacción de reducción que implica la captación de electrones por otro átomo diferente o grupo de átomos. Estas reacciones pueden o no incluir la adición de átomos de oxígeno o la pérdida de átomos de hidrógeno de la sustancia que se está oxidando⁴³.

Antes del desarrollo de una tecnología química específica para el control de los radicales libres responsables de la oxidación, el término antioxidante se aplicó a todas las sustancias que inhibían las reacciones de oxidación, independiente de su mecanismo de acción. Más recientemente, el término "antioxidantes alimentarios" se ha aplicado a aquellos compuestos que interrumpen la reacción en cadena de los radicales libres formados en la oxidación de lípidos y a los que eliminan el oxígeno singulete; sin embargo, el término no debería utilizarse con un sentido tan restrictivo⁴⁴.

Existen cientos de compuestos naturales y sintéticos con propiedades antioxidantes, aunque para su empleo en los alimentos deben cumplir ciertas exigencias, entre ellas, superar las pruebas de inocuidad. Para que su eficacia sea máxima se realizan combinaciones de antioxidantes o con diversos agentes secuestradores de metal, y se logra una acción sinérgica que proporciona una protección más completa^{45,46}.

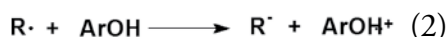
Mecanismo de acción de los antioxidantes

Para comprender el papel protector de los antioxidantes, se han propuesto dos mecanismos principales. En el primero, los radicales libres remueven un átomo de hidrógeno del antioxidante (ArOH) que, a su vez, se convierte en radical:



La alta estabilidad del radical $\text{ArO}\cdot$ corresponde a una mejor eficacia del antioxidante ArOH.

El segundo mecanismo es la transferencia de un electrón, donde el antioxidante puede dar un electrón al radical libre y convertirse en un catión radical.



En este caso, el radical catión es más estable y no reacciona con las moléculas del sustrato^{47,48}.

Pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático está relacionado con la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de oxígeno. Estos compuestos se encuentran localizados principalmente en las vacuolas y son catalizados por la enzima polifenol oxidasa, PPO, localizada en el citoplasma. Diferentes situaciones pueden causar pardeamientos: daños fisiológicos durante la maduración, algunos desórdenes en el almacenamiento y procesos tecnológicos involucrados con heridas o rompimientos de la superficie. La tendencia de las plantas a cambiar de color (más oscuras) resulta de la acción de varios factores, los cuales están naturalmente involucrados con la actividad de la enzima, la naturaleza y el contenido del sustrato oxidable. Todos estos factores varían con el tiempo de maduración de las frutas y vegetales, su estado fisiológico, la variedad y los tratamientos a las que son sometidos.

Polifenol oxidasa, PPO

Las enzimas que catalizan el pardeamiento y coloración de las frutas y vegetales pertenecen a las óxido-reductasas, y se conocen con diferentes nombres: fenoloxidasa, monofenol oxidasa, difenol oxidasa, catecolasa, tirosinasa y fenolosa; esta último es la más aceptada y su nombre corresponde a la o-difenol-oxígeno-óxido-reductasa, usualmente llamada PPO

[6]; por esta razón, su actividad ha sido ampliamente estudiada durante las últimas dos décadas^{49,50}. Desde 1992, se han hecho muchos progresos concernientes a la estructura, localización y clasificación de la PPO, particularmente debido a actividad biológica, molecular e inmunológica, y su uso en métodos químicos⁵¹.

Dependiendo de su especificidad sobre sus sustratos, se pueden agrupar en tres tipos de enzimas:

- Cresolasa (EC. 1.14.18.1 monofenol monooxigenasa).
- Catecolasa o fenolasa (EC. 1.10.3.1, o-difenol: oxígeno óxido-reductasa).
- *p*-difenofoxidasa o laccasa^{52,53}.

Así también, dependiendo del sustrato sobre el que actúa, se han definido dos clases de actividades enzimáticas: la primera denominada (“cresolasa”) cuando hidroxila monofenoles, y la segunda (“catecolasa”) oxida difenoles a quinonas. Dependiendo de la fuente, la actividad “cresolasa” es mayor o menor, incluso inexistente en algunos casos, pero, en general, todas las enzimas tienen actividad “catecolasa”.

La forma de actuación de la enzima con dos actividades distintas ha sido aclarada en parte hace pocos años, relativamente. La enzima cataliza dos reacciones porque en el estado nativo se encuentra en dos formas distintas: la llamada met-tirosinasa, que es activa solamente sobre monofenoles, y la oxi-tirosinasa. Estas formas se interconvierten entre ellas, de forma acoplada al desarrollo de las reacciones que catalizan⁵⁴.

La característica estructural más importante de estas enzimas es la presencia en su centro activo de dos iones de cobre, Cu¹⁺ (figura 1), unidos cada uno de ellos a dos⁵⁵ o tres histidinas, que se han conservado a lo largo de la evolución en todas las enzimas de este tipo, desde las bacterias al hombre. En su entorno se sitúa una serie de aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos, que también son importantes en su actividad, para la unión de los sustratos⁵⁶.

Además, existe una alta heterogeneidad entre especies y dentro de la misma especie durante las diferentes etapas del desarrollo, con el fin de expresar la actividad enzimática de la PPO que puede variar dependiendo de factores como: pH óptimo, latencia, especificidad por el sustrato, etc.⁵⁸

Mecanismo de pardeamiento enzimático

Las reacciones de formación de quinonas involucran compuestos fenólicos tipo flavonoides⁵⁹ y no fenólicos. Las quinonas resultantes de la

oxidación enzimática tienen diferentes características espectrales que dependen del fenol a partir del cual ellas se originan y el pH del medio⁶⁰. La oxidación de quinonas con otra molécula de fenol puede ser muy rápida, y depende del potencial de reducción respectiva del complejo enzima-sustrato formado. Esta reacción guía a la formación de dímeros del fenol original o regeneración del fenol. Por supuesto, sus productos están sujetos a oxidaciones futuras, ya sea por vía enzimática o por vía *o*-quinona, y dan como resultado grandes oligómeros y formación de enlaces covalentes con aminoácidos nucleofílicos para producir pigmentos insolubles y oscuros reconocidos como melaninas⁶¹. Las reacciones de *o*-quinonas con compuestos no fenólicos conducen también a la formación de pigmentos oscuros e insolubles en agua llamados melaninas⁶².

El mecanismo descrito en forma ordenada para la formación de melanina consiste en varias etapas: en la primera (hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles) la enzima liga primero el oxígeno y después el monofenol; esta etapa es determinante de la reacción, con participación de los intermediarios indicados en la figura 2. Segundo, se produce un cambio de valencia ($\text{Cu}^{1+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$), y se forma un complejo, en el que el enlace O-O está tan polarizado que se produce la hidroxilación hasta *o*-difenilos. Finalmente la oxidación del *o*-difenol hasta quinonas finaliza el ciclo⁶³.

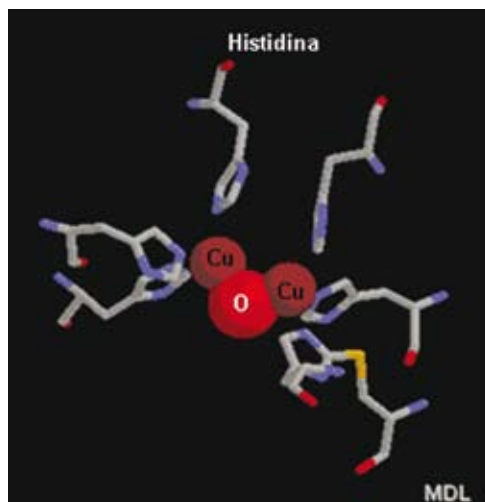
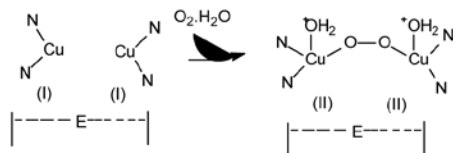


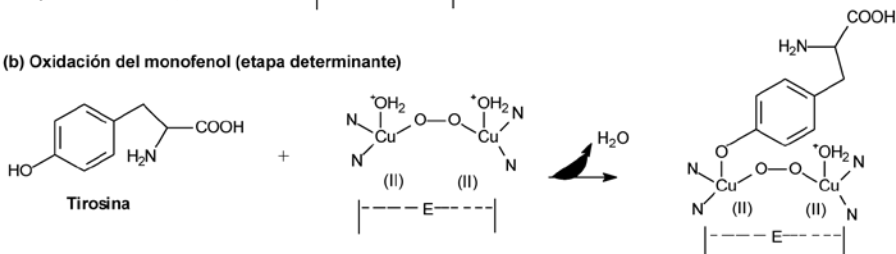
Figura 1. Estructura del sitio activo de la polifenoloxidasasa de la batata

Tomado de Calvo, M.⁵⁷

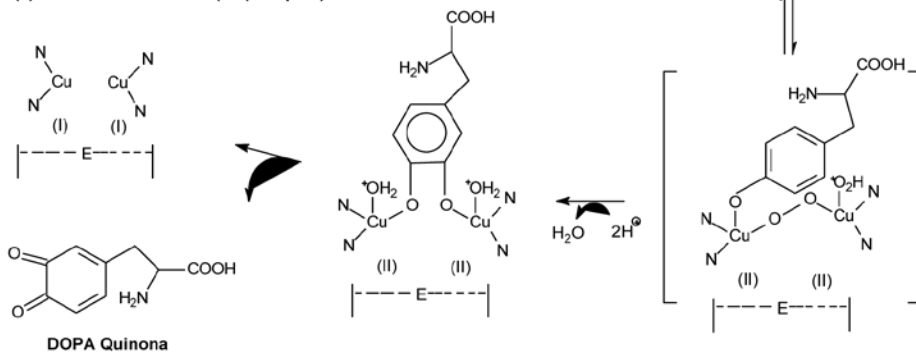
(a) Oxidación de la enzima en presencia de oxígeno



(b) Oxidación del monofenol (etapa determinante)



(c) Oxidación del difenol (etapa rápida)



(d) Reacciones no enzimáticas (oxidación de la quinona hasta melanina)

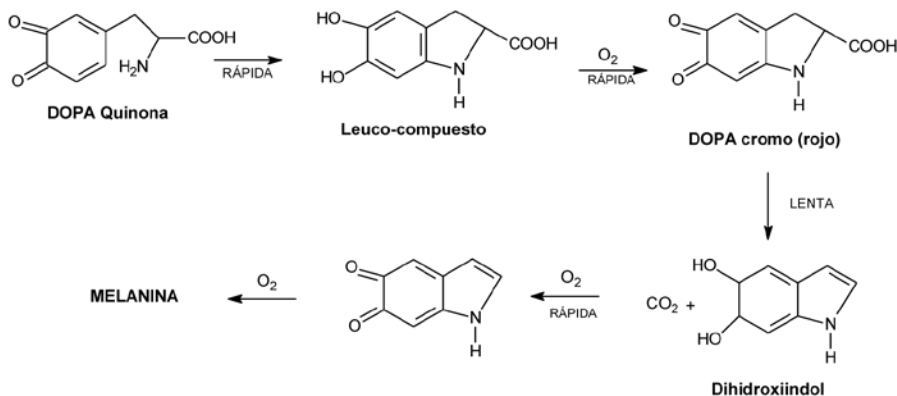


Figura 2. Oxidación de tirosina causada por PPO para producir melanina.

Tomado de Belizt, H. D.⁶⁴ y Lerner, A. B.⁶⁵

Control de pardeamiento

El control de pardeamiento es un reto en la industria de frutas y vegetales, especialmente con el desarrollo de técnicas que requieran del mínimo procesamiento de estas materias primas. Se han reportado previamente métodos biológicos-moleculares desarrollados para el control del pardeamiento. En adición, diferentes métodos para el control del pardeamiento enzimático modernos o tradicionales como los tratamientos físicos (térmicos, desecación o disminución de la a_w , congelación, refrigeración, etc.) y químicos (adición de inhibidores y otros aditivos) son aún objeto de investigación. Estas formas de control pueden dividirse en tres clases dependiendo del factor que ataquen, ya sea la enzima, el sustrato o los productos de la reacción⁶⁶.

Acción sobre la enzima

La acidificación, alcalinización y tratamientos térmicos son frecuentemente aplicados para inhibir la actividad enzimática. La alcalinización no puede ser aplicada a compuestos fenólicos por su alta sensibilidad a la oxidación a pH alcalinos. La PPO muestra su actividad óptima a un pH entre 5 y 7^{67,68,69} y la enzima parece relativamente sensible a pH ácidos. Pero, el control del pardeamiento enzimático únicamente por acidificación es muy difícil, a menos que sea a pH muy bajos.

Acción sobre los sustratos

La remoción completa del oxígeno es una forma muy satisfactoria para el control de la oxidación fenólica catalizada por la PPO, aunque este método no puede ser aplicado a tejidos vivos porque puede causar condiciones anaeróbicas y tampoco es aceptable en algunos productos frescos.

Concerniente a los sustratos fenólicos, dos opciones han sido investigadas. La primera es la eliminación física por adsorbentes específicos como la ciclodextrina⁷⁰. La segunda forma de remoción de compuestos fenólicos es por su modificación enzimática a través del uso de *o*-metil-transferasa⁷¹.

Acción sobre productos

Las *o*-quinonas pueden ser reducidas a *o*-difenoles o pueden reaccionar con otros compuestos y formar complejos no coloreados. Algunos de los compuestos reductores más usados son: el ácido ascórbico, los sulfitos, los tioles como la cisteína y los aminoácidos^{72,73}.

Recientemente, muchas técnicas nuevas son aplicadas en la prevención del pardeamiento enzimático, tales como: tratamientos físicos (irradiación, altas presiones⁷⁴, ultrasonido⁷⁵, luz pulsada, calentamiento óhmico, cocción al vacío, ultrafiltración, etc.) y químicos o biológicos (bioconservantes, atmósferas modificadas, enzimas inhibidoras, etc.) que disminuyen los riesgos que traen los tratamientos térmicos^{76,77}.

Clasificación de inhibidores

El uso de inhibidores es restringido teniendo en cuenta consideraciones relevantes como la toxicidad, el efecto sobre las características organolépticas y el costo. Los inhibidores de pardeamiento pueden ser clasificados según el modo de acción en seis categorías:

- Agentes reductores: agentes sulfhídricos, ácido ascórbico y sus análogos, cisteína, glutatión, etc.
- Acidulantes: ácido cítrico y fosfórico.
- Agentes quelantes: fosfatos, EDTA, ácidos orgánicos, etc.
- Agentes acomplejantes: ciclodextrina
- Inhibidores de enzimas: ácidos carboxílicos aromáticos, alcoholes alifáticos, aniones, péptidos, resorcinol sustituido.
- Tratamientos enzimáticos: oxigenasas, o-metil transferasas, proteasas.

Agentes reductores

Previenen el pardeamiento enzimático por la reducción de o-quinonas a o-difenoles no coloreados o al reaccionar irreversiblemente con o-quinonas para formar productos no coloreados más estables. Los compuestos derivados del azufre son los más ampliamente empleados en la industria de los alimentos.

- **Derivados de azufre.** Los derivados de azufre tienen un rol multifuncional en los alimentos; estos poseen actividad antimicrobiana e inhiben el pardeamiento tanto enzimático como no enzimático. algunas especies como el bisulfito (HSO_3^-) y sulfitos (SO_3^{2-}) ejerce un efecto competitivo con la PPO, debido al enlace formado entre este y el sitio activo de la enzima; además, este compuesto reacciona con algunos intermediarios como quinonas, que resultan en la formación de sulfoquinonas e inhiben irreversiblemente la PPO.

- Los sulfitos y sus derivados son antioxidantes químicos muy poderosos actualmente utilizados en la industria, pero que representan un potencial riesgo para la salud^{78,79}.
- **Ácido L-ascórbico.** El ácido L-ascórbico (vitamina C) es un agente reductor moderado⁸⁰⁻⁸⁴. Este previene el pardeamiento y otras reacciones oxidativas en frutas y vegetales; además, es considerado como un buen secuestrante (atrapador) de oxígeno que permite la remoción del oxígeno molecular en las reacciones de la PPO⁸⁵. Sin embargo, el ácido ascórbico es oxidado al ácido dihidroascórbico en forma irreversible durante el proceso de reducción y permite el pardeamiento posteriormente. Es muy usado el ácido cítrico en conjunto con el ácido L-ascórbico para mantener el nivel del pH en el medio [3].
- **Cisteína.** La cisteína tiene un efectivo poder inhibidor enzimático⁸⁶⁻⁸⁹, pero tiene efectos negativos sobre el sabor. La inhibición de la melanosin por cisteína es debido a la formación de o-quinonas tiol conjugadas (reacción de adición); la cisteína también muestra reducción de las o-quinonas a su fenol precursor.

Acidulantes.

Los grupos ionizables de la estructura proteica de las enzimas son afectados por el pH del medio. Estos grupos deben estar en su forma iónica apropiada a fin de mantener la conformación del sitio activo, el enlace con el sustrato o catalizar la reacción enzimática. Los cambios en la ionización son generalmente reversibles. La desnaturalización irreversible ocurre bajo condiciones extremas de pH. La estabilidad del sustrato es también afectada por el cambio del pH. Los sustratos degradados actúan como inhibidores de enzimas.

Los acidulantes son aplicados generalmente para mantener el pH por debajo del punto óptimo de actividad catalítica de la enzima. Acidulantes como el ácido cítrico, málico y fosfórico pueden inhibir el efecto de la PPO. Los acidulantes son usados frecuentemente con otros antioxidantes.

Quelantes

Las enzimas generalmente poseen iones de metales en su sitio activo. Los agentes quelantes remueven estos iones y pueden de esta forma inactivar la enzima. Tanto los complejos formados entre los agentes quelantes como los prooxidantes tales como el cobre o el hierro son inhibidores.

Agentes acomplejantes

La cavidad central de la ciclodextrina es hidrofóbica mientras que la región externa de este oligosacárido es hidrofílica, debido a la presencia de grupos hidroxilos primarios y secundarios.

La más importante propiedad funcional de la ciclodextrina es su habilidad para la inclusión de moléculas dentro del núcleo hidrofóbico o ligeramente apolar, que la convierte en un excelente inhibidor de pardeamiento en frutas frescas y vegetales crudos⁹⁰.

Inhibidores de enzimas, 4-Hexilresorcinol (4-HR)

Los resorcinolos sustituidos, compuestos *m*-difénolicos que están estructuralmente relacionados con los sustratos fenólicos, tienen un efecto inhibidor competitivo con la PPO⁹¹⁻⁹³; la sustitución hidrofóbica con hexil, dodecil y grupos ciclohexil en la posición 4 del anillo aromático del resorcinol incrementa la efectividad de su efecto inhibidor competitivo sobre la polifenoloxidasas.

El 4-HR sustituido tiene I_{50} capacidad inhibidora del 50% a una concentración de 0.2 M. La actividad de la monofenolasa y difenolasa de la tirosinasa son inhibidas por el 4-HR.

Las principales ventajas del 4-HR son: la efectividad a bajas concentraciones, la estabilidad química, la inhabilidad para decolorar compuestos preformados⁹⁴ y el alto sinergismo con el ácido ascórbico debido a que el ácido ascórbico reduce las quinonas y el 4-HR interactúa con la PPO⁹⁵.

Plantas fenólicas como antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales en alimentos pueden provenir de compuestos endógenos en uno o más componentes del alimento, de sustancias formadas de reacciones durante el procesamiento o de aditivos alimenticios aislados de fuentes naturales. La mayoría de los antioxidantes son compuestos fenólicos presentes en todas las frutas y vegetales ampliamente consumidos en la dieta diaria en forma fresca o como derivados de productos alimenticios.

Los antioxidantes fenólicos de plantas comúnmente incluyen componentes flavonoides, derivados de ácido cinámico y tocoferoles. Muchos compuestos fenólicos son buenos sustratos del pardeamiento y buenos antioxidantes como las catequinas; por el contrario, los flavonoles no son buenos sustratos de pardeamiento pero son antioxidantes muy activos.

Las fuentes naturales de las plantas antioxidantes han sido ampliamente estudiadas. Estas plantas incluyen diferentes órganos tales como semillas, frutas, hojas, entre otros.

Las plantas con contenido de fenoles y algunos de sus productos de degradación son multifuncionales y pueden actuar como agentes reductores, reaccionantes con radicales libres, quelantes y atrapadores de oxígeno singulete⁹⁶.

Los estudios más recientes sobre la planta *Oxandra* cf. *xylopioides* (*Annonaceae*), perteneciente al género de *Magnoliales*, presentan como metabolitos altamente bioactivos, el berenjenol y el isoespintanol⁹⁷⁻⁹⁹.

El Isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es uno de los compuestos aislados de las hojas de *Oxandra* cf. *xylopioides* (*Annonaceae*), el cual es considerado como un monoterpeno de estructura cristalina sólida con propiedades antioxidantes¹⁰⁰⁻¹⁰³. Los estudios más recientes acerca del efecto protector de linfocitos humanos, sometidos a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y comparado con el butilhidroxianisol (BHA), muestran como resultado una gran actividad antioxidante a bajas concentraciones, y no presentan efectos cito ó genotóxicos.

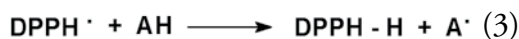
Análisis de la actividad antioxidante

Existen varios métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante; estos son de fácil aplicación y son citados a continuación:

La actividad antioxidante es ampliamente usada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación involucrando especies reactivas del oxígeno; otras se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos y la capacidad de una muestra para atrapar radicales libres^{104,105}.

Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH)

El DPPH• (figura 3) es un radical estable de color violeta, cuya absorbancia disminuye al ser reducido por un antioxidante (AH):



Esto permite cuantificar la capacidad antioxidante de las muestras, y medir el grado de decoloración de una disolución metanólica de DPPH•, a una longitud de onda de 515-517nm¹⁰⁶.

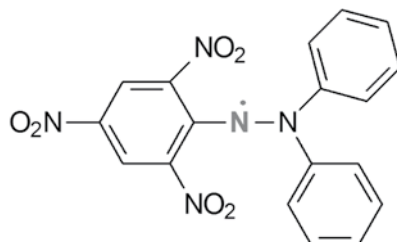


Figura 3. Estructura del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•)

Tomado de Prior; et al.¹⁰⁷

Reacción con el radical catiónico 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS^{•+})

Este ensayo es denominado también Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay)¹⁰⁸ y es uno de los más usados para la determinación de la capacidad antioxidante total. La base del método consiste en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (figura 4). El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo altamente absorbente a una longitud de onda de 415 ó 734nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2' -azino- bis-(3-etil benzotiazolin -6- sulfonato de amonio) en presencia de peroxidasas u oxidasas sobre ABTS. Una solución estable de ABTS^{•+} también puede ser preparada con agentes oxidantes tales como dióxido de manganeso o persulfato de potasio¹⁰⁹.

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el cambio de absorbancia a 732 –734 nm de la solución de ABTS ^{•+} cuando se alcanza el estado estacionario¹¹¹.

Medida de la capacidad reductora: Método Ferric Reducing/Antioxidant Power, FRAP

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir (por transferencia electrónica) el Fe⁺³

presente en un complejo con un compuesto orgánico: Tripyridyltriazine (TPTZ).

Cuando el hierro es reducido a la forma ferrosa (Fe^{+2}) toma un color azul, que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda a 593 nm (figura 5)¹¹².

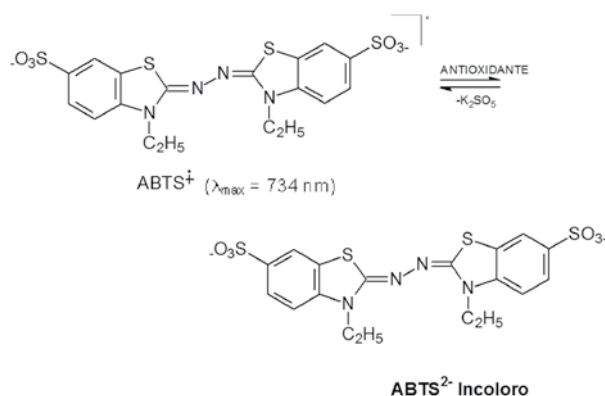


Figura 4. Reacción con el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

Tomado de Huang et al.¹¹⁰

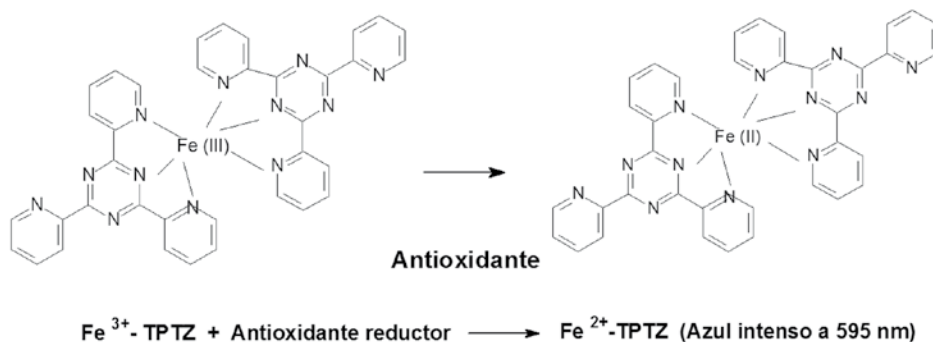


Figura 5. Reacción en el Método FRAP.

Tomado de Prior et al.¹¹³

Síntesis de compuestos

La reacción de sustitución electrofílica aromática es una de las mejores formas de introducir grupos funcionales dentro de un anillo aromático.

Esta reacción consiste en la sustitución de un hidrógeno del sistema aromático por un electrófilo y representa la reacción más importante que sufren estos sistemas como se muestra en la figura 6.

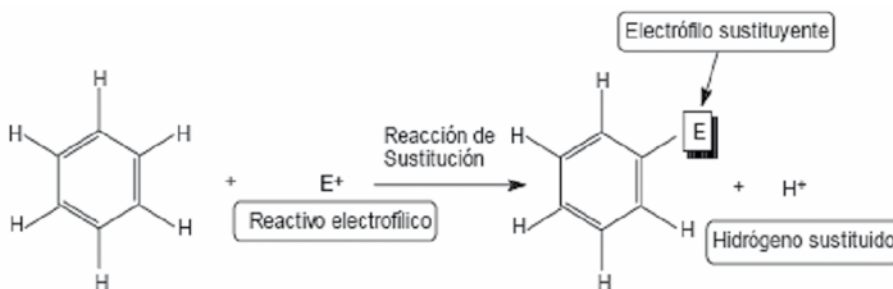


Figura 6. Reacción de sustitución electrófila aromática.

Tomado de Wingrove¹¹⁴.

Mediante esta metodología se pueden introducir grupos tales como: $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{R}$.

Estas reacciones proceden por el mecanismo típico de una sustitución electrofílica aromática ($\text{S}_{\text{E}}\text{A}$), el cual se puede visualizar en tres etapas principalmente:

- Formación del electrófilo
- Ataque de los electrones π del benceno a este electrófilo y
- Desprotonación del catión intermediario^{115, 116}.

El benceno es normalmente inerte en presencia de halógenos, debido a que los halógenos no son lo suficientemente electrofílicos para destruir su aromaticidad, sin embargo, estos pueden activarse mediante ácidos de Lewis como los haluros de hierro, FeX_3 o de aluminio, AlX_3 , para dar electrofílicos más potentes. Al hacer una revisión bibliográfica sobre las vías sintéticas para la halogenación de compuestos aromáticos polisustituidos en su gran mayoría se nos remite a la reacción de bromación¹¹⁷.

Bromación

Algunos de los métodos reportados para la realizar la bromación emplean el bromo en presencia de tetracloruro de carbono o con bromuro de dimetilsulfonio.

- **Bromación con bromo en tetracloruro de carbono.** Método realizado por tratamiento con bromo en presencia de tetracloruro de carbono y cloruro férrico como catalizador.

El mecanismo de reacción es una ilustración de la secuencia de una sustitución electrofílica clásica sobre un anillo aromático. Figura 7¹¹⁸.

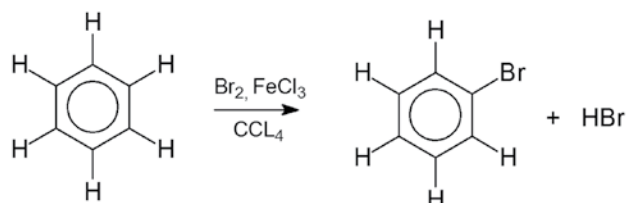


Figura 7. Bromación con bromo y tetracloruro de carbono en presencia de cloruro férrico.

Tomado de Carda¹¹⁹.

- **Bromación con bromuro de dimetilsulfonio.** Los agentes halogenados positivos tales como el bromurodimetilsulfonio de bromo son ampliamente usados en síntesis por su facilidad para su preparación y diversas transformaciones en las que se puede usar como rompimiento de tioacetales, oxidación de tioles y principalmente como otra alternativa para la bromación de bromoarenos, pues presentan altos rendimientos y estereoespecificidad.

La reacción transcurre en varias etapas:

- Formación del bromurodimetilsulfonio de bromo in situ por medio del mecanismo mostrado en la figura 8.

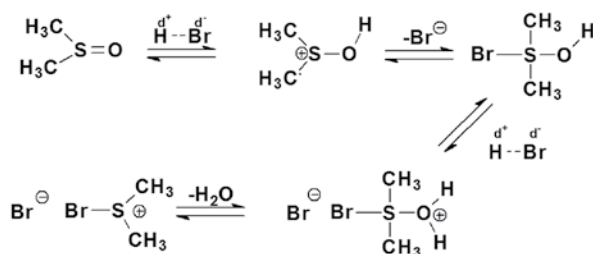


Figura 8. Bromación con bromurodimetilsulfonio de bromo in situ.

Tomado de Majetich¹²⁰.

- Sustitución electrofílica del agente halogenado positivo al anillo aromático¹²¹.

Demetilación

Como resultado de un medio ácido en la reacción de bromación de compuestos aromáticos con sustituyentes metoxi, se produce como subproducto el compuesto demetilado (no publicado antes).

Medición de la actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática de la PPO está dada por su cinética; de esta forma se puede evaluar su disminución o inhibición del pardeamiento enzimático en presencia de los antioxidantes sintetizados¹²²⁻¹²⁴.

Cinética

La velocidad a la que ocurre una reacción catalizada por una enzima está determinada por un número de factores tanto inherentes como externos a ella. Se han desarrollado varios métodos matemáticos agrupados bajo el término de cinética para la cuantificación de los factores que afectan la velocidad de reacción¹²⁵.

La medida de la cinética enzimática es de interés por dos razones principales:

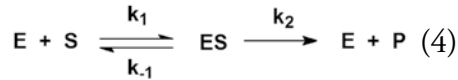
- Para caracterizar una enzima individual y proveer datos acerca del funcionamiento de la enzima bajo diferentes condiciones fisiológicas.
- Para proveer información acerca del mecanismo de catálisis¹²⁶.

La velocidad a la cual una enzima cataliza una reacción es conocida como "*actividad*"¹²⁷. La actividad enzimática puede ser medida por la velocidad de formación de productos o desaparición de reactivos en presencia de una cantidad de enzima dada; tiene más ventajas en la mayoría de los casos seguir la formación de productos mediante incrementos finitos que pequeños decrecimientos de una concentración inicial.

Teoría Michaelis – Menten

La teoría del estado estacionario de la cinética enzimática fue desarrollada por L. Michaelis y M. Menten en 1913, con modificaciones hechas por G. Briggs y J. B. S. Haldane en 1925¹²⁸. En este modelo, la enzima se

combina reversiblemente con su sustrato para formar el complejo enzima-sustrato (ES) que subsecuentemente se rompe para formar el producto, hecho que regenera a la enzima. El modelo para una molécula de sustrato se muestra a continuación:



Donde: S es el sustrato

E es la enzima

ES es el complejo enzima sustrato o complejo de Michaelis y Menten

k_1, k_{-1} y k_2 son las constantes de velocidad de la reacción.

La ecuación de Michaelis y Menten describe cómo varía la velocidad de reacción con la concentración de sustrato:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{[S] + K_M} \quad K_M = \frac{K_2 + K_{-1}}{K_1} \quad (5)$$

Esta ecuación describe una reacción en la cual un solo sustrato produce un solo producto. Así:

v es la velocidad inicial de la reacción

$V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima

K_M es la constante de Michaelis y Menten = $(k_{-1} + k_2)/k_1$

$[S]$ es la concentración de sustrato¹²⁹.

Existen varias suposiciones que consideran la teoría del estado estacionario. La primera es que la enzima y el sustrato forman un complejo, [ES]. La segunda es que la concentración del complejo [ES] no cambia con el tiempo. Por último, la concentración de sustrato [S] no cambia significativamente durante la reacción debido a que la cantidad de S es mucho mayor que la de E, de tal manera que la cantidad de sustrato unido a la enzima en cualquier momento es muy pequeña¹³⁰.

Para el análisis de reacciones enzimáticas, sólo se utiliza la velocidad inicial de la reacción, que es la velocidad ejercida por la enzima, inmediatamente después de que se ha puesto en contacto con el sustrato y hasta antes de que se haya consumido el 10 % de la concentración inicial del mismo. La razón de lo anterior es que en ese momento la concentración del producto de la reacción que se ha acumulado es muy pequeña y, por tanto, la

reacción en el sentido inverso, es decir, la transformación del producto en el sustrato original puede ser ignorada¹³¹.

De acuerdo con la ecuación del estado estacionario, la velocidad de reacción, v , incrementará proporcionalmente con el aumento de S , como es mostrado en la figura 9. Sin embargo, en la práctica, esto puede ser verdad sobre un rango limitado de concentración de enzima. Para obtener buena linealidad deben procurarse las condiciones de reacción tales que la formación de producto sea lineal con el tiempo (reacción de orden 1), y esta necesita ser directamente observada o establecida para la estandarización de las condiciones en un ensayo nuevo¹³².

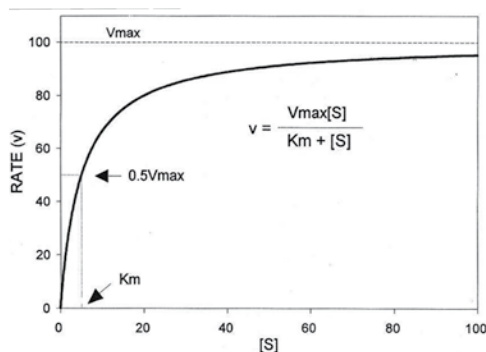


Figura 9. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción. Ecuación de Michaelis – Menten.

Tomado de Tipton¹³³.

La gráfica muestra una curva hiperbólica que aproxima a un valor máximo para v , correspondiente a una concentración infinita de S . Este valor es la velocidad máxima de reacción o V_{max} . La velocidad máxima puede ser definida como la reacción de velocidad cuando la enzima es completamente saturada con el sustrato. De la ecuación en estado estacionario, se puede ver que K_M es numéricamente igual a la concentración de sustrato donde la velocidad de reacción es la mitad de la V_{max} ($K_M = V_{max} / 2$).

La constante K_M es característica de una enzima particular para un sustrato y está dada en unidades de concentración. Cuando comparan parámetros cinéticos de diferentes enzimas, K_M refleja la afinidad de la enzima por ese sustrato; un valor numérico pequeño refleja una alta afinidad de la enzima por su sustrato porque a una baja concentración del mismo, la enzima ha desarrollado ya la mitad de la velocidad máxima.

Cuando se grafica la velocidad de la reacción, v , contra la concentración de sustrato, $[S]$, no siempre es posible determinar la condición en que se ha llegado a la velocidad máxima, V_{\max} , debido al incremento de la pendiente en la hipérbola a concentraciones de sustrato elevadas. Por tal motivo, se puede presentar un ajuste al modelo de Michaelis-Menten¹³⁴.

2.8.3 Cinética enzimática en presencia de un inhibidor. Una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos tienen la capacidad de unirse reversible e irreversiblemente a enzimas específicas y alterar su actividad. Los inhibidores competitivos, no competitivos e incompetitivos son reversibles¹³⁵.

2.8.3.1 Inhibidores reversibles, Inhibidores competitivos. Un compuesto que puede estar o no relacionado estructuralmente con el sustrato natural se une reversiblemente con la enzima en o cerca al sitio activo; la inhibición será competitiva entre el sustrato y el inhibidor. Los inhibidores competitivos son comunes en la naturaleza¹³⁶.

Una forma de medir el efecto del inhibidor es mediante la medida de velocidad enzimática para una variedad de concentraciones de sustrato en presencia y ausencia de un inhibidor. En este caso, el inhibidor sustancialmente reduce la velocidad de la enzima a bajas concentraciones de sustrato, pero no la altera mucho a concentraciones altas¹³⁷.

El inhibidor no altera V_{\max} , pero incrementa el valor de K_M (también llamada K_M aparente). La K_M observada está dada por la siguiente ecuación:

$$K_{M\text{obs}} = K_M + \left[1 + \frac{[\text{inhibidor}]}{K_i} \right]$$

- **Inhibidores no competitivos.** Los compuestos que se unen reversiblemente con la enzima o el complejo enzima sustrato se conocen como inhibidores no competitivos. Esta inhibición no es revertida completamente con el aumento de sustrato. Dado que el sitio de unión del inhibidor no es idéntico al sitio activo, ni modifica a éste directamente, la K_M no se altera, pero V_{\max} disminuye con respecto a la observada en ausencia del inhibidor¹³⁸.
- **Inhibidores incompetitivos.** Los compuestos que se combinan reversiblemente sólo con el complejo ES pero no con la enzima libre se co-

nocen como inhibidores incompetitivos. Este tipo de inhibición no es superada con altas concentraciones de sustrato, y la K_M aparente en presencia de un inhibidor es más pequeña que el valor de la K_M no inhibida¹³⁹.

Un inhibidor que es unido covalentemente a la enzima inactivándola irreversiblemente es llamado irreversible o inactivador¹⁴⁰.

Inhibidores irreversibles.

Un inhibidor irreversible forma un enlace covalente con un grupo funcional específico, por lo general una cadena lateral de un aminoácido que, de alguna manera, se asocia con la actividad catalítica de la enzima. Un inhibidor irreversible no puede ser liberado por dilución o diálisis; sus efectos no pueden ser revertidos simplemente al aumentar la concentración del sustrato. La velocidad de la reacción disminuye a un nivel que corresponde con la fracción de las moléculas de enzimas que han sido inactivadas¹⁴¹.

Las diferencias básicas entre inhibición reversible e irreversible están resumidas en la tabla 1¹⁴².

Tabla 1. Algunas diferencias básicas entre inhibidores reversibles e irreversibles.

Ecuación básica	Constante cinética	Velocidad de inhibición	reversibilidad	
			<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Reversible $E + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}, E, I}$	$K_i = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	Usualmente rápida	Dilución Diálisis: Filtración gel	Eliminación de inhibidores libres
Irreversible $E + I \xrightarrow{k} E-I$	k	Frecuentemente lenta	Ninguna	Síntesis de más enzima

Tomado de K. F.¹⁴³

Métodos para la medición del pardeamiento enzimático

Los métodos disponibles para determinar la susceptibilidad de pardeamiento son la espectrometría de absorción o métodos de reflectancia. Las técnicas de absorción involucran la medida espectrofotométrica sobre soluciones obtenidas después de separar los tejidos y remover los sólidos. Tales medidas estiman los pigmentos solubles y suelen estar presentes cerca de

400 nm, correspondientes a la absorción máxima del catecol. La medida de los pigmentos polimerizados y solubles unidos a membranas puede ser evaluada por medidas de reflectancia sobre la fracción insoluble¹⁴⁴. Actualmente existen varias técnicas que aplican este mismo principio, como es el método Pizzocaro^{145,146}.

Metodología

La metodología seguida en la síntesis y estudio del efecto inhibitor del pardeamiento enzimático fue:

Síntesis de compuestos (modificaciones estructurales del Isoespintanol)

Síntesis de 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol.

Se siguió el procedimiento citado por Majetich et al.¹⁴⁷.

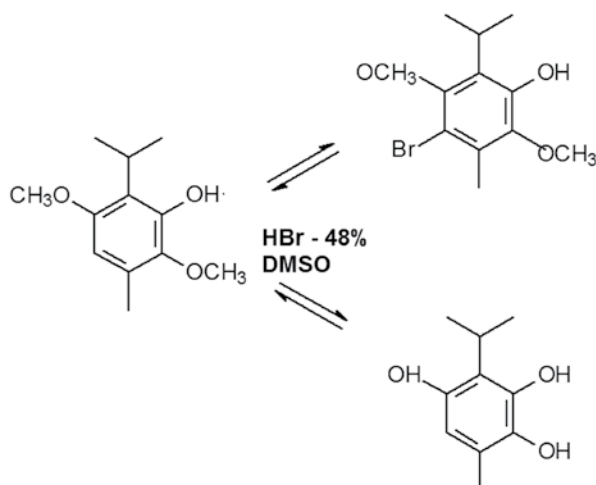


Figura 10. Bromación y demetilación del isoespintanol Majetich et al.¹⁴⁸

La bromación se llevó a cabo mediante la mezcla de 500 mg de isoespintanol en 15 ml de dimetil sulfóxido (DMSO), y 5 ml de ácido bromhídrico al 48% adicionado gota a gota. La reacción se produjo a temperatura ambiente, durante 6 horas; la desaparición del reactivo es seguida por cromatografía de placa fina con un eluyente diclorometano:hexano (3:7). La reacción se detiene con una solución saturada de bicarbonato de sodio y los productos fueron aislados usando extracciones con diclorometano,

seguido por la adición de sulfato de sodio anhídrido, para luego ser concentrada bajo presión reducida. Finalmente, el compuesto es separado por cromatografía de columna diclorometano: hexano (80:20) como eluyente y cromatografía de capa fina (ciclohexano:diclorometano 7:3 al 1% de metanol).

Síntesis de 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno.

La demetilación del isoespintanol para la obtención del 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno se obtuvo en forma paralela a la reacción de bromación. El compuesto fue separado por cromatografía de placa fina (ciclohexano: diclorometano 7:3).

Luego de la purificación de los compuestos, condición indispensable en la evaluación de actividad antioxidante, se realizó la caracterización por las siguientes técnicas de análisis instrumental:

- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C , en un espectrómetro de 300 MHz marca BRUKER modelo AM-300, utilizando como solvente cloroformo deuterado.
- Cromatografía gases-masas, en un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890N con un detector selectivo de masas marca Agilent 5973, acoplado a un Chemstation Hardware.

Medición de la actividad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos sintetizados se basó en dos métodos productores de un radical orgánico y otro basado en la óxido-reducción de iones metálicos. Las muestras fueron preparadas en DMSO. Los procedimientos son descritos a continuación:

DPPH (Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo).

El método se llevó a cabo según el protocolo de Cavin¹⁴⁹. La muestra de análisis consistió en 10 mL de extracto y 990 mL de la disolución de DPPH (20 mg/L). Se evaluó por cuadruplicado y como referencia del reactivo se usó la misma cantidad de DPPH y 10 mL del solvente de la muestra. Se produjo un blanco, reemplazando el cromóforo por metanol. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 517nm, luego de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad.

El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{1 - (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco muestra}})}{\text{Abs}_{\text{referencia}} - \text{Abs}_{\text{blanco referencia}}} \right] \times 100 \quad (7)$$

Abs: Absorbancia

Para cada compuesto se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que se define como la concentración de muestra requerida para disminuir en un 50% el contenido inicial del radical DPPH, y se determinó por medio de la gráfica “Porcentaje de inhibición contra concentración de extracto”¹⁵⁰.

ABTS (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio).

El radical $ABTS^{\bullet+}$ se produjo utilizando una mezcla de reacción que contiene ABTS (3,5 mM) y persulfato de potasio (1,25 mM) en agua destilada. La mezcla de reacción se preparó 12 horas antes de su uso y se mantuvo a temperatura ambiente y en ausencia de luz. En el momento de realizar las mediciones, esta solución se diluyó en buffer fosfato a un pH de 7.4, hasta lograr una absorbancia de 0.7 unidades a 734 nm.

En la evaluación de los compuestos se utilizaron 20 μ l de muestra y 980 μ l de la solución del radical $ABTS^{\bullet+}$. Luego de 30 minutos de reacción, tiempo necesario para a temperatura ambiente y en la oscuridad, se midió el cambio en la absorbancia respecto a la referencia del reactivo, a una longitud de onda de 734nm. La referencia del reactivo consistió en una solución del radical $ABTS^{\bullet+}$ con el solvente de la muestra (DMSO).

Se determinó igualmente la concentración necesaria para disminuir en un 50% el contenido inicial del radical $ABTS^{\bullet+}$ (IC_{50})¹⁵¹, de la misma manera que en la prueba DPPH.

Método FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power).

Este ensayo se llevó a cabo en buffer acético-acetato de sodio 0.3M a un pH de 3.4, que contiene TPTZ (1mM) y $FeCl_3$ (2mM). Se utilizan 900 μ l de esta solución, 50 μ l de muestra y 50 μ l de buffer acetato pH 3.6. Luego de 30 minutos de reacción se determina la absorbancia a una longitud de onda de 593nm. Para cada muestra se tuvo en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores. La curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico en

un rango de concentraciones de 5-40 μM . Las actividades de las muestras en estudio se expresan como AEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico: μmol ácido ascórbico /g muestra), valor que se obtiene al interpolar los resultados de las muestras en la curva referencia (“Absorbancia contra concentración de ácido ascórbico”)¹⁵².

Medición del efecto inhibitor del pardeamiento enzimático de los antioxidantes sobre la polifenol oxidasa en el extracto enzimático de banano

Determinación de parámetros cinéticos e inhibición de pardeamiento enzimático

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en fruterías de la ciudad de Medellín. Se utilizó la especie *Musa Sapientum* o comúnmente conocida como banano variedad Cavendish Gigante (Tipo exportación). Las muestras de banano fueron amarillo-verdosas. Grado de maduración 4¹⁵³ correspondiente a 18 ° Brix.

- **Extracción de la enzima.** La extracción parcial se realizó con base en el procedimiento de Palmer¹⁵⁴ con algunas modificaciones en la centrifugación y el detergente usado: en un homogenizador (marca B. Braun) se mezclaron 2 g de la fruta madura y pelada con 18 ml de buffer fosfato (0,1 M, pH 7.0), el cual, contenía detergente Triton 100X al 1%.
- El homogenato fue centrifugado (centrífuga marca Heraeus) durante 25 minutos a 16.060 g y 4°C; el sobrenadante fue filtrado con papel filtro Schleicher & Schuell 589/1. El filtrado se constituyó en el extracto enzimático utilizado en el trabajo cinético. Durante todas las operaciones de extracción, las temperaturas fueron inferiores a 4°C.
- **Ensayo de actividad de la PPO.** La actividad de la enzima fue determinada siguiendo el método de Pizzocaro modificado¹⁵⁵; se usó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160^a y se hizo el monitoreo a 420 nm y a 30°C. La mezcla de reacción consistió en 1 ml de buffer fosfato 0.1 pH 6.0, 0.5 ml de dopamina (0.18 mol/L) y 0.25 ml de extracto de enzima. El cambio en absorbancia fue registrado cada 15 s durante 3 min. La porción lineal obtenida del gráfico de absorbancia en función del tiempo fue usada para el cálculo de la actividad de la PPO. Una unidad de la actividad de PPO fue definida como 0.001 $\Delta A_{420}/\text{min}/\text{ml}$. Todos los extractos fueron analizados por triplicado.
- **Parámetros cinéticos.** Los valores de las constantes cinéticas K_M y $V_{\text{máx}}$ se calcularon mediante el método gráfico de LINEWEAVER-BURK.

Tabla 2. Volúmenes de reactivos usados para la determinación de los parámetros cinéticos, K_M y V_{max} .

Reactivo	Blanco	Ensayo
Buffer fosfato pH 6.0	1.0 ml	1.0 ml
Agua destilada	0.5 ml	-
Extracto enzimático	0.25 ml	0.25 ml
Dopamina (0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.14, 0.18, 0.22, 0.26) M	-	0.5 ml

Datos establecidos por los autores.

- **Efecto de inhibidores.** Se estudió la inhibición de la enzima usando ácido ascórbico (como referencia comercial), isoespintanol, el compuesto bromado y el demetilado. Las concentraciones del inhibidor fueron: 500 (máximo recomendado por la norma)¹⁵⁶, 1000 y 1500 ppm (concentraciones antes usadas para evaluar inhibición de pardeamiento en frutas)^{157,158}. En todos los casos el sustrato oxidable fue dopamina 0,18 M en buffer fosfato 0,1 M. La actividad enzimática se determinó mediante el método colorimétrico a 420 nm y una temperatura de 30°C.

Tabla 3. Volúmenes de reactivos usados para la determinación de la actividad enzimática en presencia de inhibidores sobre extracto de banano.

Reactivo	Blanco	Ensayo
Buffer fosfato pH 6.0	0.5 ml	1.0 ml
Agua destilada	0.5 ml	-
Extracto enzimático	0.25 ml	0.25 ml
Dopamina	-	0.5 ml
Antioxidante	0.5 ml	0.5 ml

Datos establecidos por los autores.

Análisis de resultados

Síntesis

Inicialmente se realizaron las modificaciones sintéticas al 2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol, hasta obtener dos compuestos:

- 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol.
- 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno.

La relación entre el compuesto bromado y el demetilado fue 75:25, respectivamente.

Información general de los dos compuestos

- **Solubilidad.** Ambos compuestos son insolubles en agua. Para las pruebas de inhibición enzimática se trabajó en un medio etanólico.
- **Punto de Fusión.** Se tomaron los puntos de fusión (tabla 4), debido a los altos puntos de fusión que presentan la mayoría de los compuestos fenólicos donde es conveniente derivatizarlos para obtener sustancias más volatilizables y térmicamente más estables, para facilitar su análisis en mezclas mediante GC o GC-MS¹⁵⁹.

Tabla 4. Puntos de fusión del compuesto bromado y demetilado

Compuesto	Punto de fusión (°C)
Bromado	127 – 128
Demetilado	112 – 113

Datos hallados por los autores.

Según los datos obtenidos, los puntos de fusión están dentro del rango de temperaturas a las cuales se pueden trabajar con la columna del GC-MS (HP5) que alcanza una temperatura máxima de 300°C, sin necesidad de una derivatización previa.

- **Color.** El compuesto bromado presenta una coloración naranja, y el demetilado es amarillo.
- **Estructura.** Cada una de las estructuras de las moléculas fueron optimizadas en el programa Gaussian 03¹⁶⁰, a un nivel B3LYP/6-311G(d,p). Figura 11.

La estructura optimizada permitió observar las distancias entre el H₈ y el C₉, donde se observa una posible formación de un puente de hidrógeno intramolecular, con una mayor probabilidad en el siguiente orden: isoespintanol > demetilado > bromado.

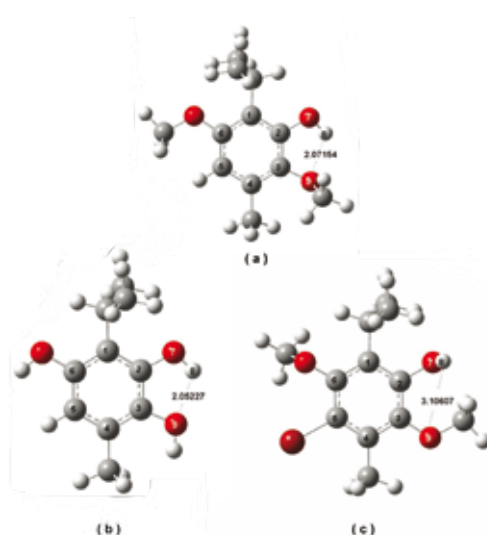


Figura 11. Estructura optimizada del isoespintanol (a), compuesto demetilado (b) y bromado (c) a un nivel B3LYP/6-311G(d,p). Estructuras logradas por los autores con el programa Gaussian 03, Revision B.05. 2003, Gaussian, Inc.

- **Pureza.** Los resultados del análisis de pureza obtenidos por cromatografía de gases acoplada a masas, GC-MS, fueron:
 - 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol: 90.8%
 - 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno: 99.1%

La pureza obtenida para los dos compuestos es suficiente para el análisis de inhibición enzimática en la que fueron probados.

Resultados de análisis instrumental

Las técnicas de análisis instrumental utilizadas para caracterizar los compuestos fueron:

- Cromatografía gaseosa acoplada a masas, GC-MS.
- Resonancia magnética nuclear, RMN de ^{13}C e ^1H .

Cromatografía gases-masas

La técnica acoplada GC-MS permitió obtener el espectro de masas y aunque esta es una técnica fundamental para obtener información estructural de los compuestos¹⁶¹, en este caso no se encontraron en las bases de

datos las estructuras objeto de estudio, debido a que los compuestos no han sido reportados por la literatura. Por tal razón, la base de identificación fueron sus pesos moleculares y el análisis de cada uno de sus espectros de masas, partiendo de la estructura esperada.

Los cromatogramas de las figuras 12, 13 y 14 permiten observar el tiempo de retención del isoespintanol, y los compuestos sintetizados, sus posibles contaminantes, al igual que el porcentaje de pureza para cada uno.

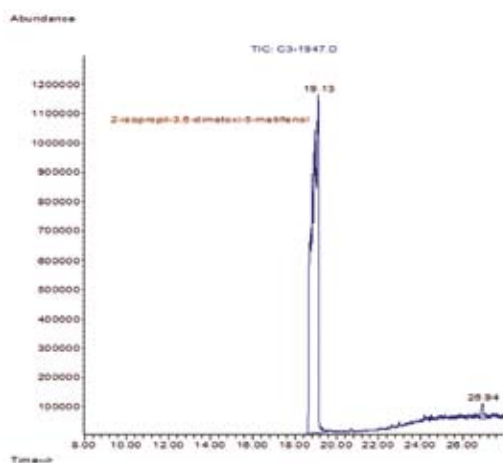


Figura 12. Cromatograma de 2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol obtenido por los autores.

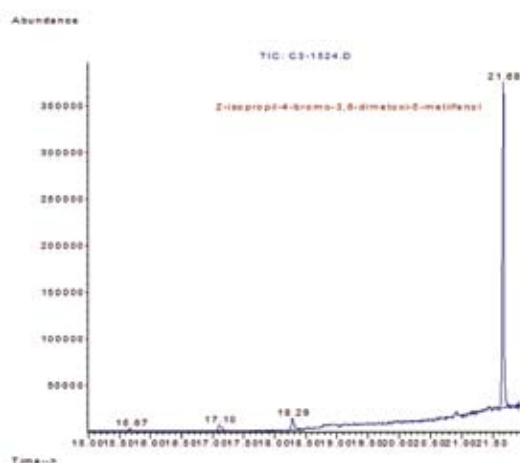


Figura 13. Cromatograma de 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol obtenido por los autores.

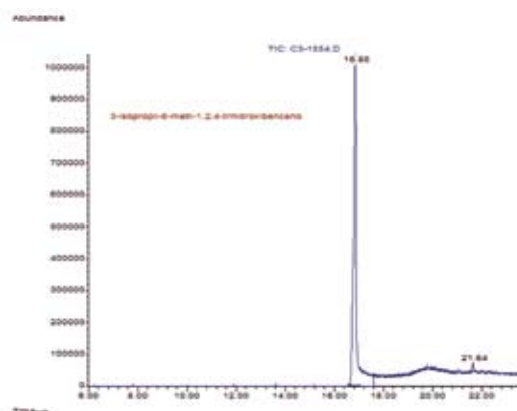


Figura 14. Cromatograma de 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno obtenido por los autores.

La ausencia de un pico a un tiempo de retención 19.13 (isoespintanol) en las figuras 13 y 14, es la forma de garantizar la presencia de un sólo compuesto con posible actividad antioxidante (figura 15).

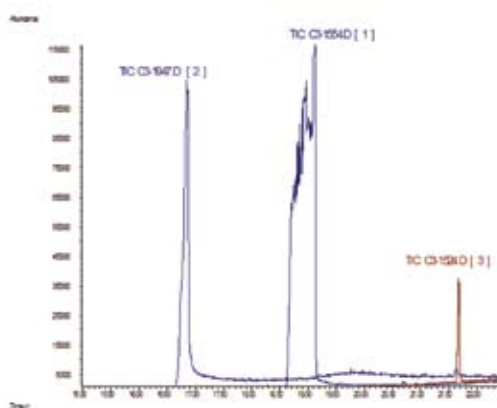


Figura 15. Cromatograma superpuesto de 2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol¹⁶², 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno¹⁶³ y 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol¹⁶⁴ obtenido por los autores.

Los fraccionamientos de masas de cada uno de los compuestos muestran que debido a la presencia de un anillo aromático en todas las estructuras, los espectros de masa tienen iones moleculares intensos, lo que facilitó la

determinación de su peso molecular. En el espectro de masas del compuesto bromado se distingue un pico base $M+2$ igual al pico $M+$ característico de este tipo de compuestos¹⁶⁵.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Muchos compuestos se pueden caracterizar químicamente a partir de los datos de cromatografía de gases y los espectros de masas cuando se cuenta con los compuestos de referencia en la base de datos, pero cuando existen dudas de tal caracterización se recurre a los métodos espectrales tradicionales como infrarrojo, ultravioleta y resonancia magnética nuclear. Por tal razón, se determinaron los espectros de RMN ^1H y ^{13}C .

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C revelan la presencia de los grupos $-\text{OCH}_3$, CH_3 , OH , CH y C aromáticos, respectivamente.

A continuación se describen los desplazamientos correspondientes a los RMN ^1H y ^{13}C del 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno y del 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol.

2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol

***HNMR** (400 MHz, CDCl_3) 1.34 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, H-8), 1.37 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, H-9), 2.33 (s, 3H, H-10), 3.44 (m, 1H, H-7), 3.75 (s, 3H, H-11), 3.78 (s, 3H, H-12), 5.80 (s, 1H, OH). **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3) δ 16.4 (C-10), 20.8 (C-8 y C-9), 26.6 (C-7), 61.2 (C-11), 61.4 (C-12), 110.4 (C-4), 126.6 (C-2), 128.5 (C-5), 142.6 (C-3), 147.5 (C-5). **EI-MS** m/z 288 (97), 290 (94), 273 (20), 275 (19).

3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.13 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, H-8), 1.14 (d, $J=7.2$ Hz, 3H, H-9), 2.08 (s, 3H, H-10), 3.20 (m, 1H, H-7), 6.48 (s, 1H, H-5), 6.96 (s, 2H, OH, C-2 y C-4), 7.28 (s, 1H, C-1). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 100 MHz) δ 15.0 (X-10), 20.2 (X-8 xp X-9), 24.5 (X-7), 125.9 (X-5), 136.2 (X-3), 136.4 (X-6), 140.9 (X-2), 51.2 (X-4), 187.7 (X-1). **EI-MS** m/z 182 [M]⁺ (5), 180 (100), 165 (25), 137 (47).

Los resultados de RMN ^1H y ^{13}C fueron satisfactorios, teniendo en cuenta que la presencia de los grupos se encuentra entre los intervalos de los δ reportados en la literatura¹⁶⁶.

Capacidad antioxidante

En la literatura se encuentra ampliamente referenciada la necesidad de utilizar más de un método cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos vegetales, debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes^{167,168}, dependiendo del sistema de reacción o de la fuente radicalaria¹⁶⁹. Los antioxidantes pueden, además, variar en su solubilidad y localización de fase, su potencial redox y su especificidad y mecanismo de acción, por lo que ensayos con diferentes características pueden brindar una información más completa al respecto. En este caso, los tres ensayos utilizados evalúan la capacidad reductora de las muestras, al actuar sobre radicales preformados en diferentes fases^{170,171}.

El Timol fue tomado como referencia para las mediciones de capacidad antioxidante por su actividad antioxidante¹⁷²⁻¹⁷⁴ y ser un compuesto fenólico de estructura similar al del Isoespintanol. El timol, a diferencia del isoespintanol, no presenta los dos grupos $-OCH_3$ en posiciones orto y meta, como se muestra en la figura 16.

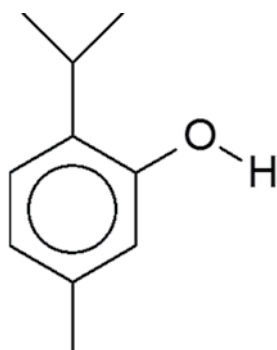


Figura 16. Estructura del Timol.
Estructura elaborada por autores en el programa Chemdraw.

Actividad atrapadora del radical libre DPPH:

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) del isoespintanol (compuesto modificado), timol (compuesto de referencia) y el compuesto bromado y demetilado (compuestos sintetizados). Los valores obtenidos se observan en la tabla 5. Un menor valor indicaría una mayor capacidad antioxidante.

Tabla 5. Actividad antioxidante del isoespintanol, compuesto bromado, demetilado y el timol por los métodos DPPH•, ABTS•+ y FRAP. Datos hallados por los autores.

COMPUESTO	ABTS IC ₅₀ (μM)	DPPH IC ₅₀ (μM)	FRAP AEAC (g de Ac. Asc./ 100g de muestra)
Isoespintanol	11.43	295.2 ± 25	65.91
Bromado	22.2	1069.44	73.00
Demetilado	103.63	448.90	14.782
Timol	9.32	656.2 ± 45	27

El DPPH• es un radical estable que tiene un color púrpura en medio metanólico, el cual es decolorado por la acción del antioxidante. Este ensayo es riguroso debido al impedimento estérico en la molécula de DPPH y esto es determinante para la reacción. Este ensayo es el más usado en la literatura científica para medir la capacidad de interacción de compuestos o extractos con radicales libres¹⁷⁵.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el isoespintanol tiene la mejor actividad antioxidante, seguido por el compuesto demetilado, en comparación con el compuesto de referencia o timol. Los resultados del bromado están muy por encima de la referencia, esto debido posiblemente al gran impedimento estérico que se presenta entre éste y la molécula de DPPH, por la presencia de un sustituyente de alto tamaño atómico (-Br) en el anillo fenólico¹⁷⁶. Además, es importante la distribución del compuesto en el medio metanólico, el isoespintanol es una molécula lipofílica, la cual, se distribuye mucho mejor que los otros compuestos, interactuando más fácil con el radical DPPH.

Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS•+

Para estos compuestos se calculó el IC₅₀, y se encontró un comportamiento similar entre el isoespintanol, bromado y timol 11.43, 22.2 y 9.32 μM, respectivamente.

La capacidad para atrapar el radical libre ABTS•+ en medio acuoso depende de la energía de disociación del enlace, BDE-OH, que en el caso del timol y del isoeppintanol son similares (-3,11 y -5,32 Kcal/mol con respecto al fenol 82.89 Kcal/mol),¹⁷⁷ y valores semejantes se esperan para

el compuesto bromado. La energía de disociación del enlace O-H esta determinada por los diferentes efectos causados por la naturaleza de los sustituyentes¹⁷⁸ en las moléculas y por los enlaces intra e intermoleculares que comprometen el enlace O-H¹⁷⁹.

Prueba FRAP (Ferric Reducing/ Antioxidant Power)

El método FRAP es muy usado para medir potencial reductor en plasma y capacidad reductora de diferentes extractos y compuestos puros¹⁸⁰. Los resultados experimentales para el isoespintanol y timol son expresados como valor FRAP y son equivalentes a los g de ácido ascórbico por cada 100 gramos del compuesto antioxidante. Los valores FRAP para el Isoespintanol, bromado, demetilado y timol son: 65.91, 73, 14.78, 27 g/100 g de muestra, respectivamente (tabla 9).

El compuesto bromado presenta la capacidad reductora más alta. Este valor puede estar determinado por la capacidad para donar electrones del bromo¹⁸¹, que le dan una mayor densidad electrónica al enlace O-H¹⁸², y son más susceptibles al ataque de agentes oxidantes como los radicales libres o metales como el Fe³⁺ que es el sitio activo en la metodología FRAP.

El isoespintanol y el compuesto bromado en los ensayos ABTS y FRAP son más activos como antioxidantes que el timol. La mayor actividad de estos compuestos está influenciada por los efectos de los sustituyentes y la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. El timol forma puentes de hidrógeno intermoleculares lineales con el solvente (agua o metanol) que disminuyen la interacción con los radicales libres, disminuyendo así, su actividad. En el caso del isoespintanol, hay una competencia entre la formación de puentes intermoleculares lineales con el solvente y la formación de puentes intramoleculares no lineales con el grupo metoxilo en posición orto (figura 15); es decir, el centro reactivo del isoespintanol (enlace O-H), queda más dispuesto para ceder electrones a radicales libres y otras especies oxidantes, aumentando su actividad antioxidante respecto al timol.

De los compuestos evaluados, el isoespintanol exhibió el potencial más promisorio como antioxidante, teniendo en cuenta que en las tres técnicas presentó actividad significativa con respecto al timol. Si se considera que en cada método las condiciones de reacción y solubilidad son diferentes, dicho extracto podría presentar varios compuestos activos en un amplio

rango de su perfil metabólico, de diferente polaridad, lo cual significa que hay una fuente mayor de metabolitos con potencial antioxidante en esta especie; fue por esta razón que se escogió como un compuesto de estudio con diferentes sustituyentes. Para sus análogos hay una acción similar, sólo que se ve favorecida por el medio para el bromado en la prueba de FRAP y para el compuesto demetilado DPPH.

La reacción con el DPPH es más selectiva que las reacciones que ocurren en los métodos ABTS y FRAP. Es decir, como compuestos que contengan ácidos aromáticos con 1 solo grupo $-OH$ no reaccionarían con el radical DPPH, pero sí lo harían con el radical ABTS¹⁸³. Se esperaría entonces que compuestos que reaccionen con el DPPH reaccionen también con el ABTS.

Inhibición de pardeamiento enzimático

Se utilizó un mismo extracto para medir la actividad enzimática. Según Palmer¹⁸⁴, el extracto con detergente usualmente retiene hasta el 90% de su actividad durante dos semanas entre 2 y 5 °C; por esta razón los ensayos se llevaron a cabo en 4 días.

El banano contiene diferentes enzimas como laccasa, monoamina oxidasas, citocromo o peroxidasa; sin embargo, el extracto obtenido está libre de cantidades significativas para interferir en la determinación de la actividad¹⁸⁵. Una vez solucionada esta interferencia, se iniciaron las mediciones de los parámetros cinéticos para dar a conocer las condiciones óptimas del ensayo.

Estudios previos muestran que monofenoles tales como tirosina, *o*-cresol o *p*-cresol no son oxidados por la PPO en la pulpa de banano. En nuestro trabajo los ensayos se llevaron a cabo con dopamina como sustrato, por ser este el mejor, según los reportes en la literatura¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Como se muestra en la figura 17, el valor de K_M de la enzima parcialmente purificada para la oxidación de la dopamina es de $2,6 \times 10^{-2}$ M mucho más alto que $6,3 \times 10^{-4}$ M reportada por Palmer¹⁸⁹ para la enzima parcialmente purificada extraída de *Musa acuminata*, var. Hort. Gros Michel y la enzima purificada completamente de la *Musa Sapientum* L., donde se reporta un valor de $2,8 \times 10^{-3}$ M¹⁹⁰, estas diferencias son evidencia de la variación entre cada variedad de la fruta.

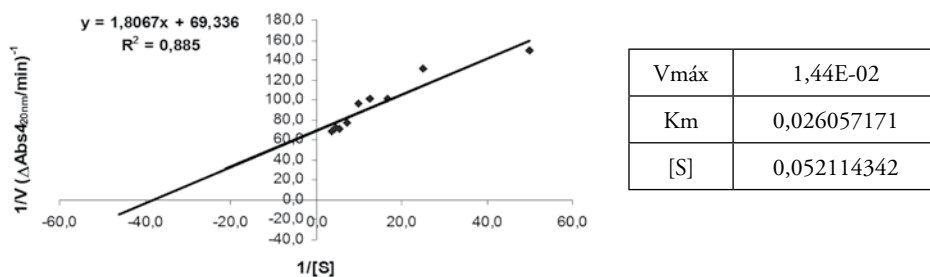


Figura 17. Gráfico Lineweaver-Burk de la oxidación de dopamina por la enzima. V, velocidad de oxidación; concentración de sustrato.

Gráfico construido por los autores.

Inhibición del pardeamiento enzimático en presencia de antioxidantes (bromado y demetilado) en comparación con el ácido ascórbico e isoespintanol.

La inhibición de la actividad en el extracto parcialmente purificado obtenido del banano en presencia del isoespintanol y dos de sus análogos (compuesto demetilado y bromado) y el ácido ascórbico como referencia comercial es reportada en la tabla 6 y los promedios en la figura 18, respectivamente.

Inhibición de pardeamiento enzimático

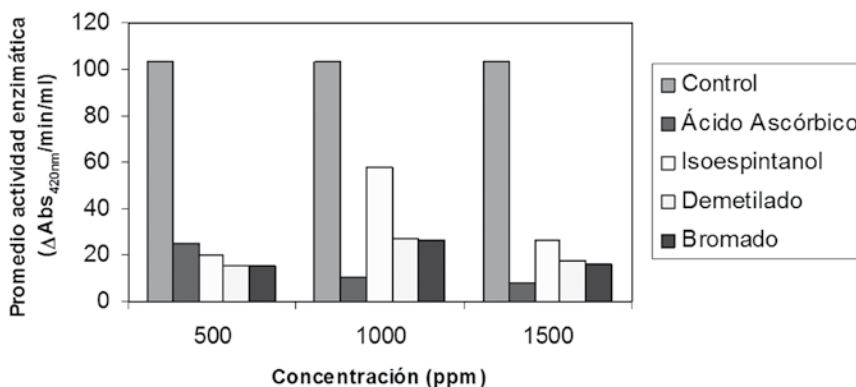


Figura 18. Promedio de la inhibición de la actividad de la PPO en banano por medio del isoespintanol y dos de sus análogos (demetilado y bromado) y ácido ascórbico. Figura elaborada por los autores.

Tabla 6. Inhibición de la actividad de la PPO en banano por medio del isoespintanol y dos de sus análogos (demetilado y bromado) y ácido ascórbico.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (ppm)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA* $\Delta Abs_{420}/min/ml$	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
CONTROL	-	102.93 ^g	-	5.1
	500	15.2 ^a	84.8	1.1
	1000	26.13 ^b	73.87	2.4
BROMADO	1500	16 ^a	84	2.8
	500	15.47 ^a	84.53	1.8
	1000	27.46 ^b	72.53	3.2
DEMETILADO	1500	17.6 ^a	82.4	0
	500	20.27 ^c	79.73	6.1
	1000	57.60 ^d	42.4	0
ISOESPINTANOL	1500	26.4 ^c	73.6	1.1
	500	24.53 ^c	75.47	2.4
	1000	10.8 ^e	89.2	0.6
ÁCIDO ASCÓRBICO	1500	8 ^f	92	3.2

* Los valores de actividades con igual subíndice indican que no existen diferencias estadísticamente significativas, entre ellas. Para el caso contrario, si existen diferencias significativas $P < 0.05$.
 Datos hallados por los autores.

El ácido ascórbico como referencia para comparar con los tres nuevos antioxidantes su acción como inhibidor de la actividad enzimática, presentó la mejor inhibición a 1000 y 1500 ppm (89.2 y 92%). La relación concentración - respuesta fue buena al disminuir la actividad a medida que aumentó la concentración, debido probablemente a su fuerte propiedad reductora¹⁹¹ y baja acidez, que pueden además reducir el pH del extracto enzimático del banano¹⁹². Efectos inhibitorios similares de este compuesto sobre la PPO en la pulpa de banano fueron demostrados en anteriores trabajos¹⁹³⁻¹⁹⁵ donde se da la inhibición total de la enzima.

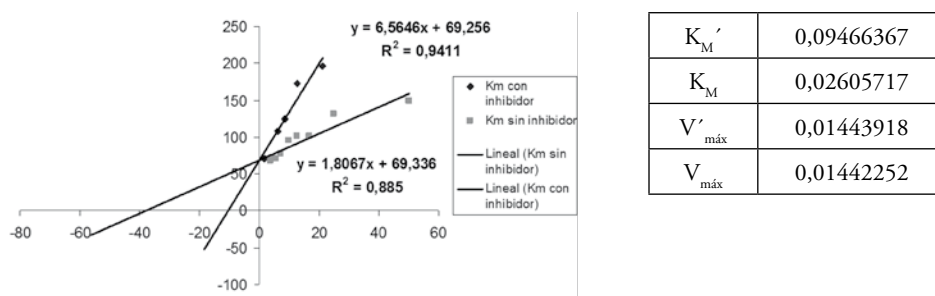


Figura 19. Doble recíproca entre las pendientes ($1/V$) en función de la concentración ($1/[S]$) del isoespintanol como inhibidor, en comparación con los datos hallados en ausencia de este. V , velocidad de oxidación; $[S]$, concentración de sustrato.

Figura elaborada por los autores.

La inhibición de la actividad enzimática del isoespintanol, demetilado y bromado no exhibió decrecimiento de la actividad de la PPO al aumentar la concentración; el principal efecto inhibitorio fue observado a una concentración de 500 ppm para los tres compuestos. Esto puede explicarse a partir del tipo de inhibición encontrado para el isoespintanol. Según la figura 19, se observa un aumento del valor K_M' y la $V_{m\acute{a}x}$ no varió significativamente, datos correspondientes al tipo de inhibidor reversible competitivo; de esta forma se puede decir que la inhibición de la actividad enzimática fue debida a la formación de enlaces competitivos del inhibidor en/ó cerca al sitio activo de la enzima^{196,197}. En este caso, el inhibidor sustancialmente reduce la velocidad de la enzima a bajas concentraciones de sustrato, pero no la altera mucho a concentraciones altas¹⁹⁸. Un comportamiento semejante se presenta con la pulpa de mango en presencia de 4-hexilresorcinol¹⁹⁹.

La formación de puentes de hidrógeno intramoleculares en compuestos fenólicos sustituidos con grupos metoxi o hidroxilos en posición orto, aumentan la estabilidad de sus radicales en 4.4 Kcal/mol^{200,201}, es por esta razón que los radicales resultantes de la acción inhibitoria del isoespintanol y el compuesto demetilado pueden ser estabilizados por la presencia de un posible puente de hidrógeno intramolecular como se mencionó anteriormente (figura 11), que les confiere una buena capacidad protectora²⁰². Esta afirmación se ve reflejada en los porcentajes de inhibición de la PPO, extraída del de banano, comprendidos entre un 42.4 – 79.73% y 72.53 y 84.53% (Tabla 10) para el isoespintanol y demetilado, respectivamente. El compuesto bromado probablemente presente estabilidad también por esta razón, pero no es predominante como en los casos anteriores, por ser mayor la distancia del posible puente de hidrógeno.

La diferencia entre el efecto inhibitorio entre el compuesto demetilado y el isoespintanol se debe probablemente a la presencia de un grupo hidroxilo en lugar de un metoxi como es el caso del compuesto demetilado, lo que permite una mayor disposición del H en posición orto para realizarse la transferencia de protón (figura 20). Similar mecanismo es demostrado para los antioxidantes di-*tert*-butilcatecol y catecol^{203,204}.

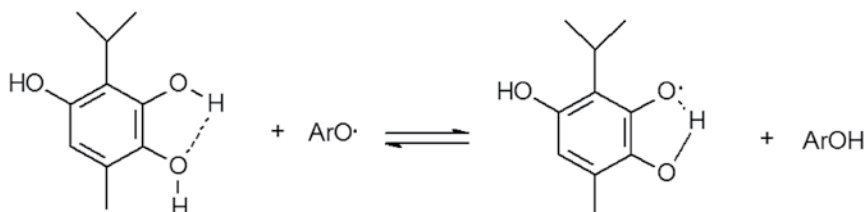


Figura 20. Formación de puente de hidrógeno intramolecular en el compuesto demetilado durante reacción con radicales. Estructuras logradas con el programa Chemdraw.

En el compuesto bromado el efecto del sustituyente marca una diferencia en la capacidad antioxidante comparada con el isoespintanol. En este caso la presencia de un bromo en la posición *para*, puede presentar dos tipos de efectos sobre el anillo aromático: primero, puede ejercer un efecto electrón donante, pero la capacidad para compartir sus electrones disminuye por el incremento de su electronegatividad, actuando como segunda posible opción el efecto electrón atrayente^{205,206} similar al Cl y F [92]. El efecto resultante, basados en los parámetros de Hammett, es una constante $\sigma_p = 0.23$ [94], lo cual indica que su acción electrón atrayente o efecto inductivo es predominante²⁰⁷, aunque su efecto no es muy marcado por tener un valor menor de 0.7. De otro lado, se ha encontrado que algunos valores de las constantes de Hammett σ_p no presentan buena correlación, especialmente cuando los sustituyentes están conjugados con el centro de reacción como los fenoles y las anilinas; de ahí que se hayan considerado en forma especial los efectos resonantes para este tipo de compuestos y hallado las constantes R , R^- y R^+ . En el caso de los fenoles *p*-Br sustituidos, el valor de $R = -0.20$ ²⁰⁸ identifica al Br como un sustituyente electrón donante²⁰⁹, justificando de esta manera cómo este compuesto con respecto al isoespintanol podría conferir mayor estabilidad al radical o catión radical formado, según el mecanismo que siga el antioxidante^{210,211}.

El efecto de sustituyentes en posición *para* ha sido objeto de estudio en muchos trabajos computacionales²¹²⁻²¹⁵, y ha sido confrontado con datos experimentales²¹⁶. Brigatti, et al²¹⁷, resumen este efecto en la figura 21. El sustituyente que produce la inestabilidad del compuesto fenólico en estado basal y/o la estabilidad del radical disminuye la energía de disociación de enlace del grupo hidroxilo²¹⁸. De otro lado, el efecto estabilizante contrario aumentará la energía de disociación. Así, los sustituyentes electrón donante actúan en forma repulsiva sobre el grupo OH en el fenol (desestabilizándolo) y atrayente en el radical (estabilizándolo), disminuyendo la energía de enlace y aumentando la velocidad de reacción con el sustrato oxidable²¹⁹. Por lo anterior, se podría inferir que al facilitarse la liberación del protón por una disminución del BDE – OH, muestra el compuesto bromado mayor efecto protector, sobre la inhibición del pardeamiento enzimático, 84.8% (Tabla 6).

En general, la modificación estructural del isoespintanol mediante la bromación y demetilación mejoró la inhibición de la actividad de la PPO entre 5 y 10% para 500 y 1000 ppm y 30% a 1000 ppm, en ambos casos.

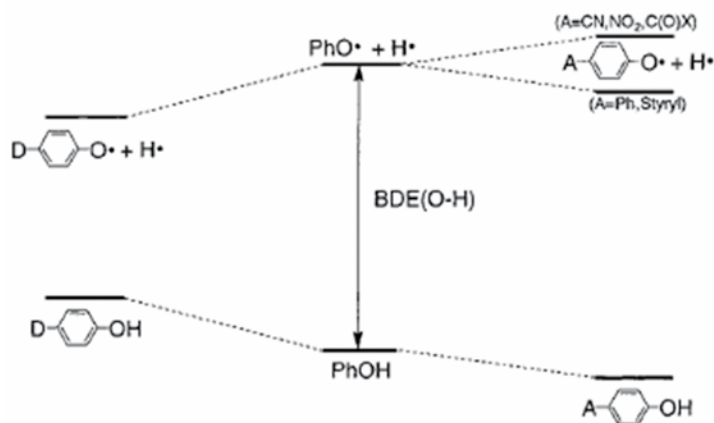


Figura 21. Efecto de sustituyente electrón atrayente y electrón donante sobre los compuestos fenólicos. Tomado de Brigati, G., et al²²⁰.

Estadísticamente, entre el compuesto bromado y demetilado no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). Los patrones de referencia (isoespintanol y ácido ascórbico) presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los dos compuestos de estudio. En general, para todos los compuestos se observaron diferencias significativas en la actividad de la PPO, al variar la concentración (1000 ppm diferente a 500 y 1500 ppm). Todos los compuestos antioxidantes presentaron diferencias significativas con respecto al control.

Conclusiones

- La síntesis del 2-isopropil-4-bromo-3,6-dimetoxi-5-metilfenol a partir del 2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol, produce paralelamente el 3-isopropil-6-metil-1,2,4-trihidroxibenceno en una relación 75:25, respectivamente.
- El isoespintanol presentó una capacidad antioxidante mejor por los tres métodos (FRAP, DPPH, ABTS), con respecto al timol. El compuesto bromado tuvo el mejor resultado por FRAP y el demetilado se comportó mejor en medio metanólico por DPPH.
- Los resultados sugieren que el isoespintanol y sus análogos bromados y demetilado son antioxidantes con un buen poder protector sobre PPO

extraída del banano.

- La mayor inhibición de la actividad de la PPO en el extracto enzimático del banano se logró a 1500 ppm de ácido ascórbico. El compuesto bromado y el demetilado lograron la misma acción protectora a 500 ppm, inhibiendo el 84% de la actividad enzimática, valor 6% por debajo del obtenido con el ácido ascórbico a altas concentraciones.
- Las modificaciones sintéticas del isoespintanol aumentaron la inhibición de la PPO ligeramente a 500 y 1500 ppm, pero significativamente a 1000 ppm.
- El isoespintanol presenta una inhibición competitiva y el ácido ascórbico actúa como reductor.
- El isoespintanol como compuesto natural y sus análogos representan una nueva alternativa como fuente inhibidora del pardeamiento enzimático.

Referencias

1. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric and sodium chloride. En: Journal of processing and preservation. 1993. Vol. 17. p. 21 - 30.
2. YANG, Shuji; *et al.* Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. En: J. Agric. Food Chem.. 2000. Vol. 48: p. 2732 - 2735.
3. MARSHALL, Maurice; KIM, Jeongmok & CHENG-I, Wei. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. Auburn, Alabama: Auburn University, 2000.
4. AMIOT, A.; *et al.* Phytochemistry of fruits and vegetables. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. Oxford: Clarendon Press, 1997. p. 51-85.
5. MacDONALD, S.; *et al.* Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. En: Food Chemistry. 2001. Vol. 73. p. 73-84.
6. YANG, Shuji; *et al.*, Op. cit., p. 2732 - 2735.
7. SALVADOR, Budui Delgar. Química de los alimentos. 4th ed. México: Pearson, 1993. 736 p.
8. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
9. VAMOS-VIGYAZO, L. The destruction of fruit cellular. En: Food Sci. Nutri, 1981. Vol. 15. p. 49-127.

10. SELLÉS, S.; CASADO, J. & BRU, R. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. En: Archives of Biochemistry and Biophysics. 2006. Vol. 446. p. 175-185.
11. MAYER, Alfred & HAREL, Eitan. Review: polyphenol oxidases in plants. En: Phytochemistry. 1979. Vol. 18. p. 193.
12. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca.; Op. cit., p. 21 - 30.
13. VAMOS-VIGYAZO, L. Op. cit. p. 49-127.
14. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
15. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca.; Op. cit. p. 21 - 30.
16. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
17. SAYAVEDRA-SOTO, L.A. & MONTGOMERY, M. W. *Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite*. En: Journal of Food Science. November 1986. Vol. 51, no. 6. p. 1531-1536.
18. WALKER, J. Enzymatic browning in foods; its chemistry and control. En: Food Technol. 1977. Vol. 12. p. 19.
19. PONTING, J. D. Control of enzymatic browning of fruits. Food Enzymes. New York.: H.W. Schultz, 1960.
20. WALKER, J.; Op. cit. p. 19.
21. SAPERS, Gerald.; *et al.* Effect of Emulsifying Agents on Inhibition of Enzymatic Browning in Apple Juice by Ascorbyl Palmitate, Laurate and Decanoate. En: Food Sci., 1989. Vol. 54, no. 4. p. 1096 - 1097.
22. SAPERS, Gerald & ZIOLKOWSKI, Michael A. Comparison of erythorbic and ascorbic acids as inhibitors of enzymatic browning in apple. En: J. Food Sci. J. Food Sci. 1987. Vol. 52. p. 1732.
23. DUDLEY, Everett & HOTCHKISS, Joseph. Cysteine as an inhibitor of polyphenoloxidase. En: J. Food Biochem. 1989. Vol. 13. p. 65-75.
24. MONTGOMERY, M.W., Cysteine as an Inhibitor of Browning in Pear Juice Concentrate. En: J. Food Sci. 1983. Vol. 48. p. 951-952.
25. SAPERS, Gerard; *et al.* Uptake and Fate of Ascorbic Acid-2-Phosphate in Infiltrated Fruit and Vegetable Tissue. En: J. Food Sci., 1991. Vol. 56. p. 419 - 422.
26. LAMBRECHT, H. S. Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. En: American Chemical Society. 1995. p. 313-323.

27. RICHARDSON, T. *Enzymes*. 2 ed. Acribia. 1985. p. 415 - 536.
28. MARSHALL, Maurice; *Op. cit.*
29. AMIOT, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 51-85.
30. BUSH, R. K.; TAYLOR, S. L. & BUSSE, W. W. A critical evaluation of clinical trials in reactions to sulfites. *En: J. Allergy Clin. Immunol.* 1986. Vol. 78. p. 191-202.
31. DAPKEVICIUS, Teris & NIEDERLANDER, Harm. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *En: Journal of Chromatography A.* 2001. Vol. 912. p. 73-82.
32. PIETTA, P. S.; *et al.* *Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites.* *En: J. Pham. Biomed. Anal.* 2000. Vol. 23, no.1. p. 223 - 226.
33. RICE-EVANS, C. Structure-antioxidants activities relationships of flavonoids and phenolic acid. *En: Free Rad. Biol Med.* 1996. Vol. 20, no. 7. p. 933 - 956.
34. ARUOMA, Okezie. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *En: Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* February-March 2003. Vol. 523-524. p. 9-20
35. HALLIWELL, B. Antioxidants: elixirs of life or tonics for tired sheep. *En: The Biochemist*, 1995. Vol. 17, no. 1. p. 3 - 6.
36. KAHKONEN, Marja; *et al.* Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *En: J. Agric. Food Chem.* 1999. Vol. 47. p. 3954 - 3962.
37. AMIOT, A.; *et al.* *Op. cit.*, p. 51-85.
38. FENEMA, O. *Química de los alimentos*. 2ª ed. Acribia, 1993. p. 415-536.
39. RICE-EVANS, C.; *et al.* The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *En: Free Radical Res.* 1995. Vol. 22. p. 375 - 383.
40. ROJANO, Benjamin; *et al.* New 24 methyl cicloartane of oxandra *Xylopiodes (Annonaceae)*. 2005.
41. ROJANO, Benjamin. Genotoxicidad y efecto protector del isoespintanol (*Oxandra of Xylopiodes*) sobre linfocitos humanos. *En: Interciencia.* 2005.
42. GALEAZZI, Maria Antonia & SGARBIERI, Valdemiro C. Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase (PPO) from dwarf variety of banana (*Musa cavendishii L.*). *En: J. Food Sci.*, 1981b. Vol. 46. p. 1404 - 1406.

43. FENEMA, O.; Op. cit. p. 415-536.
44. LEOPOLDINI, Monica; *et al.* Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. En: J. Phys. Chem. A. 2004. Vol. 108. p. 4916 – 4922.
45. MACDONALD, S.; *et al.* Op. cit., p. 73-84.
46. FENEMA, O.; Op. cit. p. 415-536.
47. LEOPOLDINI, Monica; *et al.* Op. cit. p. 4916 – 4922.
48. WRIGHT, James; JOHNSON, Erin R. & DILABIO, Gino A. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. En: J. Am. Chem. Soc. 2001. Vol. 123. p. 1173-1183
49. VAMOS-VIGYAZO, L. Op. cit. p. 49-127.
50. ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. & ESKIN, N. Oxidative enzymes in food. Londres: Elsevier Applied Science, 1991. p. 217-273.
51. AMIOT, A.; *et al.* Op. cit., p. 51-85.
52. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
53. BELITZ, H. & SCHIEBERLE, P. Food Chemistry. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, S. A., 2004. p. 105 - 172.
54. CALVO, Miguel. Bioquímica de los alimentos. Zaragoza: Acribia, S. A., 2002.
55. BELITZ, H. & SCHIEBERLE, P.; Op. cit. p. 105 - 172.
56. CALVO, Miguel.; Op. cit.
57. Ibid.
58. ROBARDS, Kevin; *et al.* Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. En: Food Chemistry. 1999. Vol. 66. p. 401-436.
59. Ibid., p. 401-436.
60. AMIOT, A.; *et al.* Op. cit., p. 51-85.
61. SELLÉS, S.; CASADO, J. & BRU, R.; Op. cit. p. 175-185.
62. CALVO, Miguel.; Op. cit.
63. BELITZ, H. & SCHIEBERLE, P.; Op. cit. p. 105 - 172.
64. Ibid., p. 105 - 172.
65. LERNER, A. B. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. En: Adv. Enzymol. 1953. Vo. 14. p. 73-128.

66. AMIOT, A.; *et al.* Op. cit., p. 51-85.
67. VAMOS-VIGYAZO, L. Op. cit. p. 49-127.
68. ROBARDS, Kevin; *et al.* Op. cit., p. 401-436.
69. GUERRERO-BELTRÁN, Barry & BARBOSA, Gustavo. Inhibition of Polyphenoloxidase in mango puree with 4-Hexilresorcinol, cysteine and ascorbic acid. En: *Lebensm. - Wiss. + Technol.* 2005. Vol. 38, no. 6. p. 625-630.
70. PAGINGTON, J. S. Beta-cyclodextrin and its uses in the flavour industry. *Developments in food flavours*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p. 131-150.
71. FINKLE, B. J. & NELSO, R. F. Enzyme reactions with phenolic compounds: effect of o-methyl-transferase on a natural substrate of fruit polyphenoloxidase. En: *Nature*. 1963. Vol. 197. p. 902-903.
72. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
73. AMIOT, A.; *et al.* Op. cit., p. 51-85.
74. CHEN, J. S.; *et al.* Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. En: *J. Agric. Food Chem.* 1992. Vol. 40. p. 2345 - 2349.
75. LÓPEZ, Pascual; *et al.* Inactivation of peroxidase, lipoxygenase, and polyphenol oxidase by manothermosonication. En: *J. Agric. Food Chem.* 1994. Vol. 42. p. 252 - 256.
76. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
77. ESCALONA, V. H.; *et al.* Modified atmosphere packaging inhibits browning in fennel. En: *Lebensm. - Wiss. + Technol.* 2004. Vol. 37, no. 1. p. 115 - 121.
78. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
79. BENZIE, Iris & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. En: *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 239. p. 70 - 76.
80. SAPERS, Gerald.; *et al.* Op. cit. p. 1096 - 1097.
81. EL-SHIMI, N. M. Control of enzymatic browning in apple slices by using ascorbic acid under different conditions. En: *Plants Food Human Nutrition*. 1993. Vol. 43. p. 71 - 76.
82. SANTERRE, C. & VanNorman, D. J. En: *J. Food Sci.* 1988. Vol. 53. p. 1713 - 1716.
83. SAPERS, Gerard; *et al.* Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. En: *J. Food Sci.* 1989b. Vol. 54. p. 997 - 1002.

84. SAPERS, Gerard & Pilizota, V.; Op. cit.p. 1049 - 1053.
85. GUERRERO-BELTRÁN, Barry & BARBOSA, Gustavo.; Op. cit. p. 625-630.
86. SAPERS, Gerard; *et al.* Op cit. p. 419 - 422.
87. MONTGOMERY, M. W. Cysteine as an Inhibitor of Browning in Pear Juice Concentrate. En: J. Food Sci. 1983. Vol. 48. p. 951 - 952.
88. MOLNAR, P. I.; and Friedman, M. *Inhibition of browning by sulfur. amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods.* J. Agric. Food Chem., 1990a. **38**: p. 1648 - 1651.
89. MOLNAR, Ibolya & Friedman, Mendel. *Inhibition of browning of sulfur amino acids. Part. 2. Fruit juices and protein-containing foods.* En: J. Agric. Food Chem. 1990b. Vol. 38. p. 1652 - 1656.
90. HICKS, Kevin; SAPERS, Gerard & SEIB, Paul. Process for preserving raw fruit and vegetables juice using Ciclodextrins and compositions thereof. US Patent, 1990. p. 293. (N° de patente 4975293).
91. McEVELILY, Arthur; IYENGARA, Radha & OTWELL, Steven. Inhibition of enzymic browning in food and beverages. En: Critical Review in Food Science and Nutrition. 1991. Vol. 32, no. 3. p. 253 - 273.
92. IYENGARA, Radha; *et al.* En: Food Technol. 1995. p. 110 - 118.
93. OTWELL, Steven & McEVELILY, Arthur. Inhibition of shrimp melanosis by 4-hexylresorcinol. En: J. Aquat. Food Product Technol. 1992. Vol. 1. p. 53 - 65.
94. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
95. GUERRERO-BELTRÁN, Barry & BARBOSA, Gustavo.; Op. cit. p. 625-630.
96. AMIOT, A.; *et al.* Op. cit., p. 51-85.
97. ROJANO, Benjamin; *et al.* Op cit.
98. ROJANO, Benjamin; Op cit.
99. ROJANO, Benjamin; *et al.* Crystal structure of natural monoterpene Isoespin-tanol. En: Analytical Science. 2005.
100. ROJANO, Benjamin; *et al.* Op cit.
101. ROJANO, Benjamin; Op cit.
102. ROJANO, Benjamin; *et al.* Crystal structure of natural monoterpene Isoespin-tanol. Op cit.
103. MONTOYA MARTÍNEZ , Sergio Andrés; et al. Evaluación de Isoespin-tanol aislado de Oxandra cf. Xylopioides (*Annonaceae*) sobre Spodoptera Frugiperda

- Je Smith (*Lepidoptera: Noctuidae*). En: Revista Facultad Nacional de Agronomía. 2007. Vol. 60, no. 1. p. 3691-3702
104. ARUOMA, Okezie.; *Op. cit.*, p. 9-20
 105. ARNAO, A. y ACOSTA, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. En: Free Rad. Res. 1999. Vol. 3. p. 89-96
 106. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. y BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 1995. Vol. 28. p. 25-30.
 107. PRIOR, Ronald L. y K. S. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53, no. 10. p. 4290 - 4302.
 108. *Ibid.*, p. 4290 - 4302.
 109. PANNALA, T. S.; O'BIREN, J. y RICE-EVANS, C. B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. En: *Biophys.* 2001. Vol. 282. p. 1161-1168.
 110. HUANG, Boxin; and PRIOR, Ronald L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. En: *J. Agric. Food Chem.* 2005. Vol. 53, no. 6. p. 1841 - 1857.
 111. ARNAO, A. & ACOSTA, M.; *Op. cit.*, p. 89-96
 112. BENZIE, Iris & STRAIN, J. J.; *Op. cit.*, p. 70 - 76.
 113. PRIOR, Ronald L. y K. S.; *Op. cit.*, p. 4290 - 4302.
 114. WINGROVE, A. S. *Química Orgánica*. México: Harla Harper & Row Latinoamericana, 1981.
 115. *Ibid.*
 116. PINE, S. H. *Química Orgánica*. 2ª ed. México: McGraw-Hill, 1988.
 117. CARDA USÓ, Alberto; MURGA CLAUDELL, Juan; FALOMIR VENTURA, Eva. El benceno y derivados - *Química Orgánica*. 2003.
 118. *Ibid.*
 119. *Ibid.*
 120. MAJETICH, G. H. y REISTER, S. Electrophilic, aromatic bromination using bromodimethyl-sulphonium bromide generated in situ. En: *J. Org. Chem.* 1997. Vol. 62. p. 4321-4326.

121. RUBINSON, K. A. y RUBINSON, Judith F. Análisis instrumental. Madrid: Prentice, 2001. p. 522-525.
122. SILVERSTEIN, R.; BASSLER, Clayton y MORRILL, Terence. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. 1ª ed. México: Diana, 1980. p. 17-31; 171 – 211
123. HESSE, M.; MEIER, Herbet y ZEEH, Bernd. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Madrid: Síntesis, 1995. p. 219 – 222.
124. CONN, E. S.; BRUENING, G. and DOI, R. Bioquímica Fundamental. 5ª ed. ed. I. Ed. John Wiley and Sons. Balderas (México): Noriega Editores, 1987. p. 131-182.
125. HENCHT, S. Bioorganic Chemistry. New York: Oxford university press, 1998. p. 21-26.
126. CONN, E. S.; BRUENING, G. and DOI, R.; Op. cit., p. 131-182.
127. HENCHT, S.; Op. cit., p. 21-26.
128. DIXON, M. Enzymes. 3ª ed. New York: Academic Press, 1979.
129. VÁZQUEZ CONTRERAS, E. Bioquímica y Biología molecular. [En línea]. 2003 [Citado el 31 de agosto de 2006.]. Url disponible en: <http://bq.unam.mx/~evazquez>
130. HENCHT, S.; Op. cit., p. 21-26.
131. VÁZQUEZ CONTRERAS, E.; Op cit.
132. TIPTON, K. F. Patterns of enzyme inhibition, in Enzymology. San Diego: BIOS Scientific Publisher Limited, 1996. p. 77-84.
133. Ibid., p. 77-84.
134. VÁZQUEZ CONTRERAS, E.; Op cit.
135. TIPTON, K. F.; Op. cit., p.77-84.
136. CONN, E. S.; BRUENING, G. and DOI, R.; Op. cit., p. 131-182
137. MOTULSKY, H. J. & CHRISTOPOULOS, A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. San Diego: GraphPad Software Inc., 2003.
138. METZLER, D. E. Bioquímica. Las reacciones químicas en las células vivas. Barcelona: ed. S.A. Omega, 1981. p. 312 - 371.
139. CONN, E. S.; BRUENING, G. and DOI, R.; Op. cit., p. 131-182
140. MOTULSKY, H. J. & CHRISTOPOULOS, A.; Op. cit.

141. CONN, E. S.; BRUENING, G. and DOI, R.; Op. cit., p. 131-182
142. TIPTON, K. F.; Op. cit., p.77-84.
143. Ibid., p.77-84.
144. MEYDAV, S. S.; et al. Browning determination in citrus products. En: J. Agric. Food Chemistry. 1977. Vol. 25, no. 3. p. 602-604.
145. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca.; Op. cit., p. 21 - 30.
146. GUERRERO-BELTRÁN, Barry & BARBOSA, Gustavo.; Op. cit. p. 625-630.
147. MAJETICH, G. H. y REISTER, S.; Op. cit. p. 4321-4326.
148. Ibid., p. 4321-4326.
149. CAVIN, A. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. En: Plant Med. 1998. Vol. 64. p. 393 - 396.
150. SÁNCHEZ-MORENO, C. L. & SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. En: J. Sci. Food Agric. 1998. Vol. 76, no. 2. p. 270 - 276.
151. RE, R. P.; *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free Rad. Biol. Med. 1999. Vol. 26. p. 1231-1237.
152. BENZIE, Iris & STRAIN, J. J.; Op. cit., p. 70 - 76.
153. SAENZ, M. J. Estudios sobre la dinámica de maduración de bananos del cultivar FHIA-2. Costa Rica: Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, 1999. p. 114.
154. PALMER, J. K. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. En: Plant Physiol. 1963. Vol. 38. p. 508 - 513.
155. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca.; Op. cit., p. 21 - 30.
156. COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. *Resolución N°4124 de 1991*. Bogotá: El Ministerio, 1991. p. 3.
157. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca.; Op. cit., p. 21 - 30.
158. GUERRERO-BELTRÁN, Barry & BARBOSA, Gustavo.; Op. cit. p. 625-630.
159. DOS SANTOS, R. Energetics of the O-H Bond in Phenol and Substituted Phenols: A Critical Evaluation of Literature Data. En: J. Phys. Chem. 1998. Vol. 27, no. 3. p. 707.
160. FRISCH, M. J.; *et al.* *Gaussian 03 Revision B.05*. Pittsburgh, PA: Gaussian Inc., 2003.
161. HESSE, M.; MEIER, Herbet y ZEEH, Bernd.; Op. cit. p. 219 – 222.

162. PIZZOCARO, Danila; and GILARDI, Gianluca.; Op. cit., p. 21 - 30.
163. YANG, Shuji; *et al.*, Op. cit., p. 2732 - 2735.
164. MARSHALL, Maurice; Op. cit.
165. DOS SANTOS, R.; Op. cit., p. 707.
166. PIETTA, P. S.; *et al.*; Op. cit., p. 223 - 226.
167. LEOPOLDINI, Monica; *et al.* Op. cit. p. 4916 – 4922.
168. WRIGHT, James; JOHNSON, Erin R. & DILABIO, Gino A. ; Op. cit., p. 1173-1183.
169. SACCHETTI, 2005.
170. PRIOR, Ronald L. y K. S.; Op. cit., p. 4290 - 4302.
171. SCHLESIER, H. M.; BOHM, V. & BITSCH, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. En: Free Radical Res. 2002. Vol. 36, no. 2. p. 177-187.
172. KAHKONEN, Marja; *et al.* ; Op. cit., p. 3954 - 3962.
173. Lagouri, V. B.; *et al.* Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. En: Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 1993. 1997. p. 20 - 23.
174. V. G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. En: Food Chem. 1999. Vol. 64. p. 59–66.
175. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. y BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 1995. Vol. 28. p. 25-30.
176. *Ibid.*, p. 25-30.
177. ROJANO, Benjamin; *et al.* Experimental and Theoretical Determination of the Antioxidant Properties for Isoespinanol. En: *Theochem.* 2008. Vol. 877. p. 1 - 16.
178. CHANDRA, A.K. & TADAFUMI. The O-H bond dissociation energies of substituted phenols and proton affinities of substituted phenoxide ions: a DFT study. En: *Int. J. Mol. Sci.* 2002. Vol. 3. p. 407 - 422.
179. LUCARINI, Veronica & PEDULLI, Gian Franco. Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. En: *J. Org. Chem.* 2002. Vol. 67. p. 928 - 931.
180. BENZIE, Iris & STRAIN, J. J.; Op. cit., p. 70 - 76.
181. HANSCH, C. L. & TAFT, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters. En: *Chem. Rev.* 1991. Vol. 91. p. 165-195.

182. WU, Y. *A density functional study of substituent effects on*. En: J. Org. Chem. 1996. Vol. 61. p. 7904 - 7910.
183. ROGINSKY, 2005.
184. PALMER, J. K.; Op. cit., p. 508 - 513.
185. Ibid., p. 508 - 513.
186. YANG, Shuji; *et al.*; Op. cit., p. 2732 - 2735.
187. PALMER, J. K.; Op. cit., p. 508 - 513.
188. GRIFFITHS, L. A. Detection and identification of polyphenol oxidase substrate of banana. En: Nature. 1959. Vol. 184. p. 58 - 59.
189. PALMER, J. K.; Op. cit., p. 508 - 513.
190. YANG, Shuji; *et al.*; Op. cit., p. 2732 - 2735.
191. McEVELILY, Arthur; IYENGARA, Radha & OTWELL, Steven.; Op. cit., p. 253 - 273.
192. TANNENBAUM, S. T. & YOUNG, V. R. Vitamins and minerals, in Food Chemistry, O.R. Fennema, Editor. USA: Marcel Dekker, 1985. p. 477 - 544.
193. YANG, Shuji; *et al.*; Op. cit., p. 2732 - 2735.
194. GALEAZZI, Maria Antonia & SGARBIERI, Valdemiro C.; Op. cit., p. 1404 - 1406.
195. SOJO, M.M.; GARCIA-CARMONA, F. & SANCHEZ FERRER, A. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8,000 for removal of polyphenols. En: J. Agric. Food Chem. 1998. Vol. 46. p. 4924 - 4930.
196. McEVELILY, Arthur; IYENGARA, Radha & OTWELL, Steven.; Op. cit., p. 253 - 273.
197. CONN, E. S.; BRUENING, G. and DOI, R.; Op. cit., p. 131-182
198. MOTULSKY, H. J. & CHRISTOPOULOS, A.; Op. cit.
199. GUERRERO-BELTRÁN, Barry & BARBOSA, Gustavo.; Op. cit., p. 625-630.
200. DE HEER, M. I. & Mulder, P. Poly Methoxy Phenols in Solution: O-H Bond Dissociation Enthalpies, Structures, and Hydrogen Bonding. En: J. Org. Chem. 1999. Vol. 6, no. 19. p. 6969 - 6975.
201. DE HEER, M.I.; *et al.* Hydrogen Atom Abstraction Kinetics from Intramolecularly Hydrogen Bonded Ubiquinol-0 and Other (Poly)methoxy Phenols. En: J. Am. Chem. Soc. 2000. Vol. 122, no. 10. p. 2355 - 2360.
202. LUCARINI, Veronica & PEDULLI, Gian Franco.; Op. cit., p. 928 - 931.

203. WRIGHT, James; JOHNSON, Erin R. & DILABIO, Gino A. ; Op. cit., p. 1173-1183.
204. LUCARINI, Veronica & PEDULLI, Gian Franco.; Op. cit., p. 928 - 931.
205. RITCHIE, C. D. Physical organic chemistry. 2ª ed. New York.: Marcel Dekker Inc. p. 91 - 105.
206. ISAACS, N. S. Physical organic chemistry. 2ª ed. L.S. Technical. p. 149 - 165.
207. Ibid., p. 149 - 165.
208. HANSCH, C. L. & TAFT, R. W.; Op. cit., p. 165-195.
209. Ibid., p. 165-195
210. LEOPOLDINI, Monica; *et al.* Op. cit. p. 4916 – 4922.
211. WRIGHT, James; JOHNSON, Erin R. & DILABIO, Gino A.; Op. cit., p. 1173-1183.
212. CHANDRA, A.K. & TADAFUMI.; Op. cit., p. 407 - 422.
213. WU, Y.; Op. cit., p. 7904 - 7910.
214. BORDWELL, F.G.; SATISH, A. V. & Cheng, J. P. Assessment of the Importance of changes in ground-state energies on the bond dissociation enthalpies of the O-H bonds in phenols and the S-H bonds in thiophenols. En: J. Am. Chem. Soc. 1994. Vol. 116. p. 6605 - 6610.
215. WRIGHT, J. S.; McKAY, D. J. & INGOLD, K. U. Theoretical Calculation of Substituent Effects on the O-H Bond Strength of Phenolic Antioxidants Related to Vitamin E. En: J. Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119, no. 18. p. 4245 - 4252.
216. DOS SANTOS, R.; Op. cit., p. 707.
217. BRIGATI, G. L.; *et al.* Determination of the substituent effect on the O-H bond dissociation enthalpies of phenolic antioxidants by the EPR Radical Equilibration technique. En: J. Org. Chem. 2002. Vol. 67. p. 4828-4832.
218. GALEANO, Paula L.; *et al.* Synthesis and antioxidant activity of two isoespin-tanol derivatives. En: Rev. Colomb. Quim. 2010. Vol. 39, no. 2. p. 173-180.
219. LUCARINI, Veronica & PEDULLI, Gian Franco.; Op. cit., p. 928 - 931.
220. BRIGATI, G. L.; *et al.*; Op. cit., p. 4828-4832.

