

APLICACIÓN DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA LUMINOL-PERBORATO-Co(II) PARA LA ENSEÑANZA DE LAS RELACIONES ESTRUCTURA-REACTIVIDAD EN MOLÉCULAS ORGÁNICAS

José Antonio Murillo Pulgarín

joseantonio.murillo@uclm.es

Luisa Fernanda García Bermejo

luisafernanda.garcia@uclm.es

Universidad de Castilla - La Mancha, España.

Armando Carrasquero-Durán

acarrasquerod@gmail.com.

UPEL Maracay, Venezuela

Recibido: 17/07/2013. **Aceptado:** 23/10/2013

RESUMEN

Se ha desarrollado un método de inyección en flujo continuo para la determinación de la actividad antirradical de compuestos fenólicos, como una medida de su actividad antioxidante, que pueda ser utilizado en los cursos universitarios de fisicoquímica orgánica para interpretar las reacciones con base en las relaciones estructura-reactividad. El método se basó en la inhibición de la quimioluminiscencia del luminol (QL) inducida por la especie de oxígeno reactivo que se forman durante la descomposición del perborato catalizada por el Co(II): A las condiciones óptimas de operación, la actividad antirradical es medida medida en términos de la CI_{50} (la concentración del compuesto fenólico requerida para reducir en un 50 % la emisión QL in la ausencia de los compuestos antirradicales). Con este propósito, el porcentaje de inhibición (%Inh) es representado en función a la concentración de la muestra. El método fue evaluado en presencia de ácido cafeico, hidroquinona, timol, ácido salicílico, fenol, resorcinol, catecol y *p*-hidroxibenzaldehído. Los resultados mostraron que el ácido cafeico y la hidroquinona tuvieron la mayor actividad antirradical, la cuales fueron dependientes de las estructuras y reactividades de los compuestos evaluados. El método resultó adecuado para una determinación, simple, rápida y precisa de la actividad antirradical de compuestos fenólicos de origen natural o sintético.

Palabras clave: FIA; Quimioluminiscencia, actividad antirradical, reactividad, fenoles

APPLICATION OF THE LUMINOL-PERBORATE-CO(II) CHEMILUMINESCENCE IN THE TEACHING OF THE STRUCTURE-REACTIVITY RELATIONSHIPS OF ORGANIC MOLECULE.

ABSTRACT

A flow injection analysis (FIA) methodology has been developed for the estimation of the radical scavenging activity of phenolic compounds as a measure of their antioxidant activity, which can be employed in the organic physical chemistry courses at university level. The method was based on the inhibition of the luminol chemiluminescence (CL) induced by the oxygen reactive species formed during the Co(II) catalyzed perborate decomposition. At the optimum operational

conditions, the antiradical activity is measured in terms of the CI_{50} (the phenolic concentration required to reduce in a 50 % the CL emission in the absence of antiradical compounds). For this purpose the percentage of CL inhibition (% Inh) against the sample concentration was plotting. The method was evaluated employing caffeic acid, hydroquinone, tymol, salycilic acid, phenol, resorcinol, catechol and *p*-hydroxybezaldehyde. Results showed that the caffeic acid and hydroquinone had the highest antiradical activities which were dependent on the molecular structures and reactivity of the phenols evaluated. The method resulted adequate for a fast, simply and accurate estimation of the antioxidant activity of the phenolic compounds present in natural or artificial sources.

Keywords: FIA, Chemiluminescence, antiradical activity, reactivity, phenolics

Introducción

Para entender el comportamiento de los compuestos orgánicos durante las reacciones, ya sean de síntesis de otros compuestos o en los sistemas vivos, es necesario conocer su estructura molecular y cómo ésta influye en el tipo de reacciones en las que un compuesto en particular puede participar. Esto también determina aspectos cuantitativos como por ejemplo, la velocidad de la reacción, las energías de activación y los cambios en otras funciones termodinámicas como la entalpía y la entropía. Por estas razones, los cursos universitarios de química orgánica dedican gran parte de sus contenidos programáticos al tema de las relaciones entre la estructura y la reactividad.

En estos temas los estudiantes deben aprender y aplicar conceptos fundamentales como energía de resonancia, efectos electrónicos inductivos y efectos asociados a la estereoquímica de los compuestos. Por tal razón, es necesario reforzar las clases teóricas con actividades experimentales que permitan a los estudiantes interpretar reacciones reales utilizando dichos conceptos.

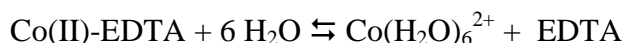
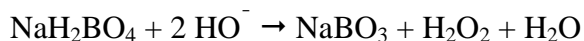
La reacción quimioluminiscente del luminol es muy sencilla y tiene las ventajas de ocurrir de manera rápida y de emitir una radiación en la región visible del espectro electromagnético que es muy fácil de detectar. Esta reacción ocurre cuando interactúa el luminol con radicales libres, tales como las especies reactivas de oxígeno, lo que se presta para el estudio de las propiedades antioxidantes de muchos compuestos orgánicos.

El propósito de este estudio fue el de diseñar y evaluar un sistema simple, de bajo costo y rápido para la determinación de la actividad antirradical de diversos compuestos orgánicos basados en la inhibición de la quimioluminiscencia producida durante la oxidación del luminol y al mismo tiempo, establecer si el método analítico propuesto es capaz de discriminar entre los distintos compuestos en función a las diferencias en sus estructuras moleculares.

Fundamentos químicos de la propuesta

En este trabajo se propone la aplicación método basado en la desactivación de las especies reactivas de oxígeno que se forman durante la descomposición del perborato de sodio catalizada por el ión Co(II). Estos radicales libres promueven la oxidación del luminol, lo cual se manifiesta por la emisión de radiación en la región visible del espectro. Sin embargo, en presencia de moléculas que exhiban la capacidad de desactivar a estos radicales libres, la emisión quimioluminiscente (QL) disminuye en una forma proporcional a la actividad antirradical de dichas moléculas (Atanassova y col. 2005, Parejo y col. 2000). Por lo tanto, el método propuesto se basa en un sistema de inyección en flujo continuo en el que los extractos que contienen a los antioxidantes se hacen reaccionar con la mezcla luminol-perborato-Co(II) y, dependiendo de la magnitud de la inhibición de la emisión quimioluminiscente, se mide la actividad antirradical.

El método emplea una disolución de luminol amortiguada a pH 10, que contiene iones Co(II) acomplexados con el ion etilendiaminotetraacetato (EDTA). Esta disolución se mezcla con otra de perborato de sodio a fin de dar origen a la siguiente secuencia de reacciones:



En la última reacción se produce el radical hidróxido (HO[•]), que reacciona con la molécula de luminol, produciéndose el anión aminoftalato en su estado electrónicamente excitado. Cuando esta molécula excitada regresa a su estado fundamental produce la emisión de radiación QL, la cual es registrada por el sistema de detección.

Si en el medio de reacción existe, además, un compuesto capaz de reaccionar más rápidamente con los radicales HO[•], debe producirse una disminución en la emisión, debido a que se forma un número menor de moléculas de aminoftalato (Dapkevicius y col. 1999).

De acuerdo con el esquema de la figura 1, existen diferentes rutas de acción por medio de las cuales los antioxidantes pueden inhibir la emisión QL del luminol. Una de las más importantes se asocia a la desactivación de los radicales hidroxilos. Los compuestos antioxidantes también pueden

actuar sobre otras especies reactivas de oxígeno, evitando la formación del endoperóxido, que es un producto intermedio necesario para obtener al aminofталato excitado (Giokas y col. 2007).

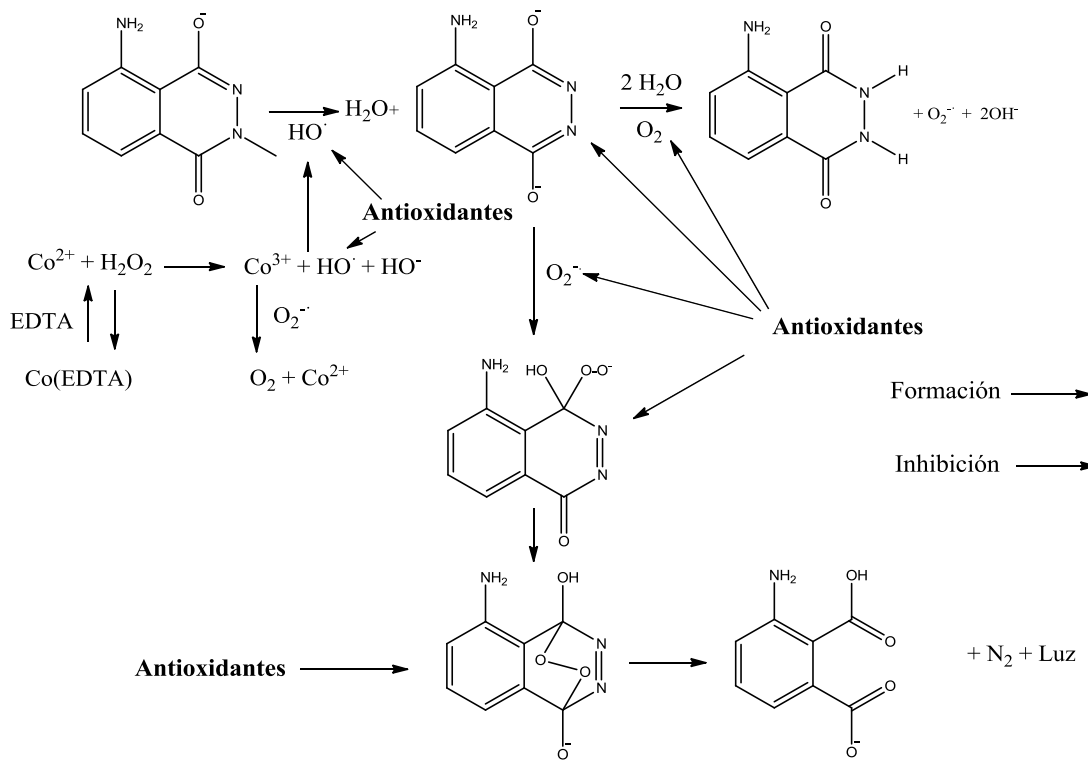


Figura 1 Esquema del proceso de emisión/inhibición de la quimioluminiscencia en presencia de sustancias antioxidantes.

Es importante señalar que la magnitud del efecto antirradical depende de la estabilidad del radical que se forma sobre la molécula del antioxidante, la cual a su vez está condicionada por la estructura molecular del compuesto. En el caso de los alcoholes aromáticos, objeto de este estudio, el tipo y ubicación de los grupos funcionales en el anillo bencénico determinará el grado de estabilidad del radical formado, al permitir o no la formación de híbridos de resonancia o generar efectos inductivos que determinarán el poder antioxidante del compuesto.

Materiales y métodos

Reactivos

Se utilizaron reactivos de grado analítico para la preparación de las distintas disoluciones requeridas en este estudio. Asimismo, para evaluar el efecto de compuestos fenólicos con distintas estructuras moleculares sobre los valores de % Inh_{50} , se construyeron curvas de inhibición para los

siguientes compuestos: fenol, catecol, resorcinol, hidroquinona, ácido salicílico, *p*-hidroxibenzaldehído, timol, ácido gálico y ácido cafeico.

Montaje experimental y procedimiento

El equipo que se describe a continuación puede ser armado por los propios estudiantes sin ninguna dificultad, lo que les permitiría el beneficio adicional de ser ellos mismos quienes construyan sus propios equipos experimentales. En este caso se empleó un sistema de inyección en flujo continuo como el mostrado en la figura 2, constituido por una bomba peristáltica (Gilson minipuls3 modelo M312) provista de tres canales hechos con tubos de teflón de 1.6 mm de diámetro interno. En el primero de ellos se transportaba la disolución de luminol amortiguada a pH 10.5 que, adicionalmente, contenía el complejo de Co(II) con EDTA. Para ajustar el pH se utilizó un regulador de borato 0.1 mmol L^{-1} .

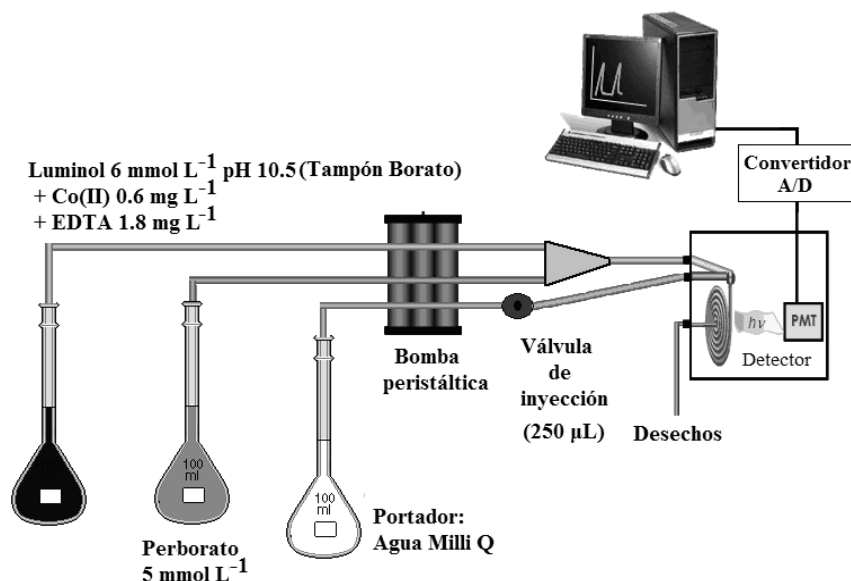


Figura 2 Sistema utilizado para evaluar la actividad antioxidante de infusiones y bebidas

La disolución de este primer canal se mezclaba en una unión tipo T con la disolución de perborato sódico que era transportada continuamente a través del segundo canal. Finalmente, la mezcla era impulsada hasta la celda del sistema de detección. El detector registraba una emisión de radiación visible constante producida por la oxidación del luminol que se denominó **Intensidad QL máxima** (I_{\max}).

En el tercer canal se impulsa agua ultrapura para transportar la muestra del antioxidante, la cual se introduce al sistema por medio de una válvula de inyección de seis canales. Esta muestra llega hasta la celda del detector donde se encuentra con la mezcla proveniente de los dos primeros canales, con el propósito de provocar la disminución de la emisión QL, hasta alcanzar un valor mínimo denominado **Intensidad mínima (I_{\min})**.

El sistema de detección estuvo constituido por un detector Camspec Chemiluminescence Detector CL-2, equipado con un módulo fotosensor Hamamatsu 45773-20, de repuesta espectral entre 300 y 900 nm. El detector dispone de dos canales de entrada que se mezclan en un celda de detección en forma de espiral. La intensidad de luz emitida se mide por medio de un tubo fotomultiplicador (PMT).

El sistema esta provisto de un convertidor analógico/digital int7, sobre una tarjeta PCI con 1 entrada y 8 salidas digitales. Las salidas emplean un voltaje máximo de 10 V y una intensidad de 1 A y, por medio de éstas, se puede controlar dispositivos externos a través del ordenador, como por ejemplo la parada/encendido de la bomba peristáltica.

Para el control, adquisición y tratamiento de los datos se utilizó un ordenador personal dotado de un microprocesador AMD Athlon XP +1600 y una memoria RAM de 256 MB, en el cual estaba insertado la tarjeta convertidora A/D int7. El sistema operativo que tenía instalado este equipo fue el Microsoft Windows XP y el software utilizado para la adquisición y procesamiento de los datos fue el Clarity versión 2.4.1.77 de Data Apex.

Por medio del sistema de detección se obtienen registros de intensidad en función del tiempo. Por ejemplo, un registro típico es mostrado en la figura 3, donde puede observarse la emisión QL inicial, que determina el valor de I_{\max} , seguida de la disminución producida por el efecto antirradical de los componentes de la muestra inyectada, tomando la forma de un pico negativo, donde el valor mínimo corresponde a I_{\min} .

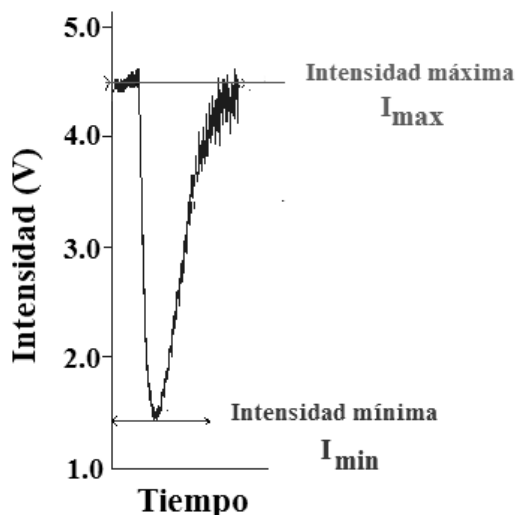


Figura 3 Registro que muestra la inhibición de la emisión QL de la oxidación del luminol por la presencia de un antioxidante.

El efecto antirradical se cuantifica por medio del porcentaje de inhibición, que se simboliza en este trabajo como %Inh, y es calculado por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Inh = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}} \times 100$$

La capacidad antioxidante de cada compuesto fenólico se cuantificó a través del valor de la Concentración de Inhibición-50 (CI₅₀), que es definida como la concentración del antioxidante que produce una disminución del 50 % de la emisión quimioluminiscente. Para determinar el valor del CI₅₀, fue necesario preparar un conjunto de disoluciones de cada antioxidante en un determinado intervalo de concentraciones, seguidamente dichas disoluciones se inyectaban en el sistema y se medía el grado de inhibición producido.

Con estos datos se elaboraron las curvas de inhibición en las cuales se representaba gráficamente el porcentaje de inhibición frente a la concentración del antioxidante. Por interpolación de dicha curva se obtenía la concentración necesaria para alcanzar una inhibición del 50 %. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

Resultados y discusión

Relación estructura/reactividad en la determinación QL del CI₅₀ en compuestos fenólicos

La figura 4 muestra las curvas quimioluminiscentes de inhibición para cada uno de los compuestos estudiados y a partir de ellas se calculó los valores del %Inh₅₀ mostrados en el cuadro 1. Es bien conocido que la actividad antioxidante de un compuesto fenólico está relacionada con su capacidad para reaccionar con las especies reactivas de oxígeno, formando radicales libres más estables. La estabilidad de estos nuevos radicales depende del tipo y ubicación de los grupos funcionales unidos al anillo bencénico; por ejemplo, la molécula de fenol que posee un solo grupo electrodonante (-OH), exhibió un valor de CI₅₀ igual a 48.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Tomando ese valor como referencia, se obtuvo la siguiente secuencia de actividad antirradical: resorcinol < fenol < catecol < hidroquinona < phidroxibenzaldehído < ácido salicílico < timol < resorcinol.

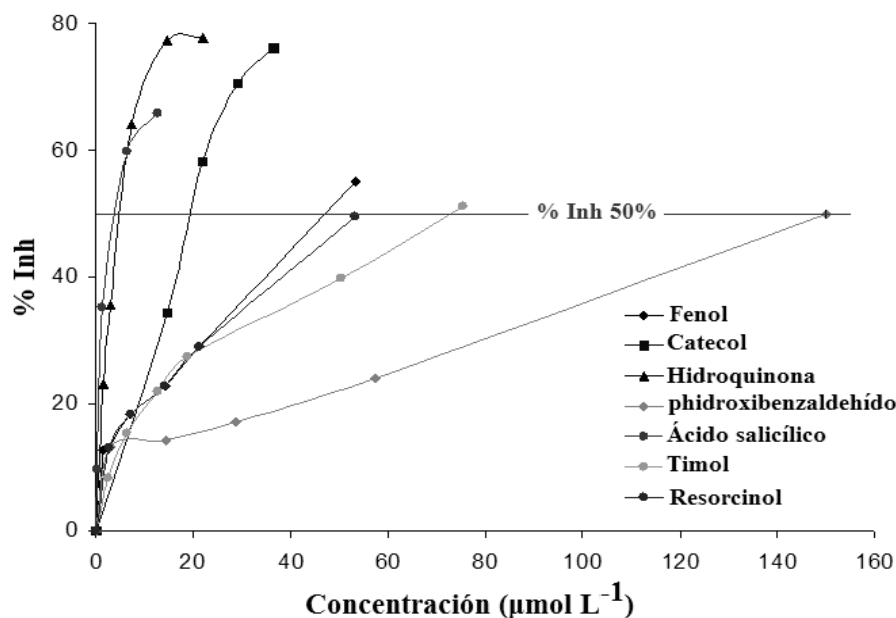


Figura 4 Curvas de inhibición de los compuestos fenólicos puros.

Cuadro 1: Valores de CI_{50} para los compuestos fenólicos puros.

Compuesto	$CI_{50} \mu\text{mol L}^{-1}$
Fenol	48.3 ± 1.2
Catecol	18.8 ± 0.91
Resorcinol	55.0 ± 1.3
Hidroquinona	4.51 ± 0.25
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	150 ± 6
Ácido Salicílico	3.90 ± 0.24
Timol	73.2 ± 0.8
Ácido Cafeico	10.0 ± 0.4

El incremento de la actividad antioxidante con respecto al fenol se debe tanto a la presencia del grupo –OH adicional como a su ubicación en el anillo aromático. Por ejemplo, en el catecol (figura 5) el segundo hidroxilo se encuentra en posición *orto*, facilitando en condiciones alcalinas la formación de complejos con el Co(II) a través de los pares de electrones no compartidos de los átomos de oxígeno. Además de esto, hay que considerar que la ruptura homolítica de uno de los enlaces O-H producirá un radical libre, el cual se estabiliza por medio de efectos resonantes e inductivos, que se ven favorecidos por la presencia del grupo electrodonante en la posición *orto*.

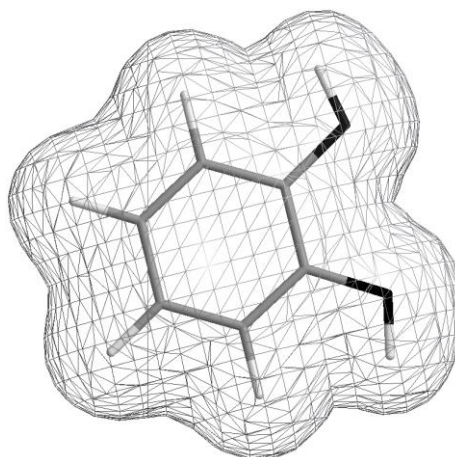


Figura 5: Molécula de catecol.

En la hidroquinona (figura 6) se produce una situación diferente, ya que es una molécula muy simétrica (grupo puntual D_{2h}), en la cual los hidroxilos se ubican en los carbonos 1 y 4 del anillo bencénico y, en este caso, cuando se forma el radical libre por la ruptura homolítica de una de las uniones O-H, el electrón desapareado puede colocarse en el carbono adyacente al -OH de la posición *para*, contribuyendo en mayor medida a la estabilización por efectos inductivos y conjugativos, por lo que se incrementa la actividad antioxidante con respecto a los otros isómeros y al fenol (Carey y Sundberg 2007).

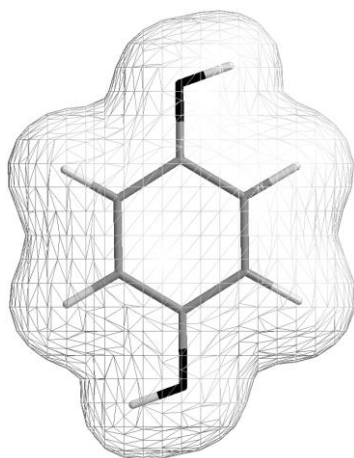


Figura 6: Molécula de hidroquinona

El resorcinol (figura 7) mostró una actividad antioxidante ligeramente inferior a la del fenol, lo cual podría tener su explicación en la presencia del segundo hidroxilo en la posición *meta*, por lo que su contribución por efectos inductivos y conjugativos es mucho menor que en el caso de la hidroquinona. Al sustituir en la molécula de catecol un grupo hidroxilo por un grupo funcional carboxilo se obtiene el ácido salicílico, produciéndose un incremento significativo de la capacidad antioxidante, con una CI_{50} de $3.9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Este incremento se debe tanto al efecto del grupo -COOH sobre el número de estructuras o híbridos de resonancia que pueden producirse; como a la capacidad del ácido para formar quelatos con los iones Co(II) , limitando su acción catalítica sobre la descomposición del peróxido de hidrógeno y, en consecuencia, en la menor producción de especies reactivas de oxígeno.

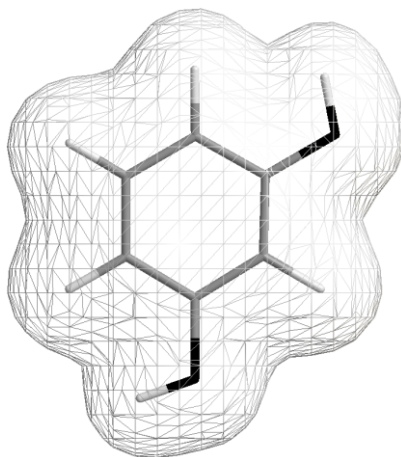


Figura 7: Molécula de Resorcinol

La sustitución en la hidroquinona de un $-OH$ por un grupo formilo para formar el *p*-hidroxibenzaldehído (Figura 8), disminuyó la actividad antioxidante hasta alcanzar un valor de CI_{50} igual a $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, debido principalmente a que el aldehído aromático tiene una menor capacidad como agente reductor. Por otro lado, el ácido cafeico, que es un antioxidante presente en muchos sistemas de alimentos, fue el antioxidante más activo después de la hidroquinona. Esto es consecuencia de la presencia de dos grupos hidroxílicos del anillo de catecol, además de un doble enlace de la cadena lateral, que contribuye en la estabilización del radical al incrementar el número de los híbridos de resonancia (Son y Lewis, 2002).

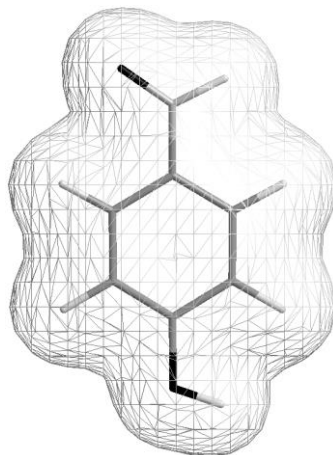


Figura 8 Molécula de *p*Hidroxibenzaldehído

En el caso del timol (Figura 9), los grupos metilo e isopropilo en la molécula disminuyen la actividad antioxidante con respecto al fenol debido a que estos grupos no contribuyen con la

estabilización del radical libre al no formar estructuras resonantes y aportan muy poca estabilidad por efectos de tipo inductivo .

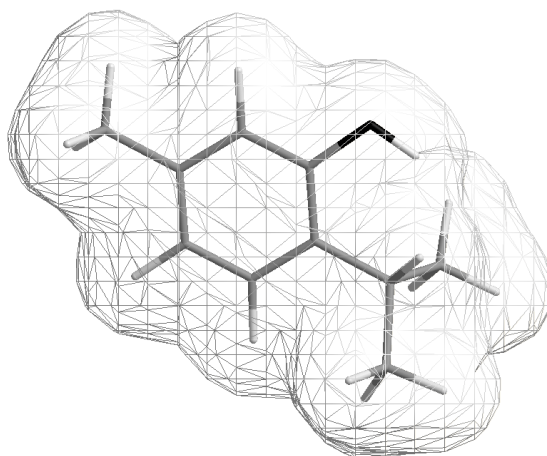
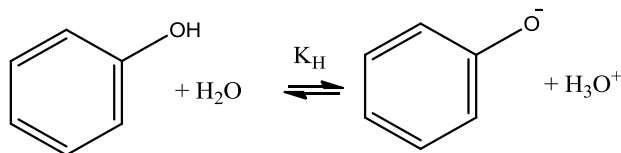


Figura 9: Molécula de Timol

Aplicación de la ecuación de Hammett

Tomando como ejemplo los isómeros del hidroxifenol, se aplicó la ecuación de Hammett a fin de establecer una relación cuantitativa entre la capacidad antioxidante medida por el método QL y la presencia de los grupos hidroxílicos en posiciones *meta* y *para*. En esta ecuación se asumió que en una molécula aromática como el fenol, los efectos de los sustituyentes sobre las constantes de ionización pueden ser empleados para predecir la influencia de esos mismos sustituyentes en una variedad de reacciones, entre las cuales están las reacciones que involucran a los radiales libres (Miller, 2004).

La ionización del fenol puede representarse por medio de la siguiente ecuación:

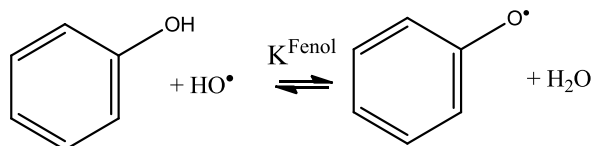


La forma general de la ecuación de Hammett para esa reacción es la siguiente:

$$\text{Log}\left(\frac{K_{a\text{Isómero}}}{K_{a\text{Fenol}}}\right) = \rho_{\text{Ionización}} \sigma_{\text{Ionización}}$$

Donde $K_{a\text{ Fenol}}$ corresponde a la constante de ionización ácida del fenol. El término $K_{a\text{ Isómero}}$ representa la primera constante de disociación ácida de los isómeros *meta* y *para* del

hidroxifenol. Para la reacción que involucra la desactivación de los radicales libres, la ecuación química toma la forma:



La ecuación de Hammett se plantea de la siguiente manera:

$$\text{Log}\left(\frac{K^{\text{Isómero}}}{K^{\text{Fenol}}}\right) = \rho_{\text{Desactivación}} \sigma_{\text{Desactivación}}$$

En esta ecuación, los términos $K^{\text{Isómero}}$ y K^{Fenol} son las constantes de velocidad de las reacciones del radical libre con el fenol y sus isómeros geométricos. Aplicando el modelo de Hammett, el término $\sigma_{\text{Desactivación}}$ puede obtenerse a partir de las constantes de ionización de los compuestos fenólicos. Por lo tanto, asumiendo que $\rho_{\text{Ionización}}$ es igual a la unidad se tiene que:

$$\text{Log}\left(\frac{K_{\text{a}}^{\text{Isómero}}}{K_{\text{a}}^{\text{Fenol}}}\right) = \sigma_{\text{Ionización}} = \sigma_{\text{Desactivación}}$$

Debido a que las constantes de velocidad $K^{\text{Isómero}}$ y K^{Fenol} no son conocidas, pero están relacionadas con la capacidad antirradical de los compuestos, se ha definido el término “**Actividad Antioxidante Relativa**” (AAR), que se calcula dividiendo entre el valor de CI_{50} del fenol a los resultados de CI_{50} de cada compuesto, por lo que valores de AAR mayores que la unidad implican una actividad antioxidante mayor que la del fenol. De tal forma que la ecuación de Hammett queda finalmente de la siguiente forma:

$$\text{Log}\left(\frac{CI_{50}^{\text{Isómero}}}{CI_{50}^{\text{Fenol}}}\right) = \rho_{\text{Desactivación}} \text{Log}\left(\frac{K_{\text{a}}^{\text{Isómero}}}{K_{\text{a}}^{\text{Fenol}}}\right)$$

El cuadro 2 presenta los datos necesarios para aplicar el modelo de Hammett, obteniéndose una dependencia lineal entre el logaritmo de la actividad antioxidante relativa y el valor de σ para el fenol y los isómeros *m* y *p* del hidroxifenol (figura 10). Esta línea recta pasa por el origen del eje de coordenadas cartesianas, punto que corresponde al fenol, utilizado como molécula de referencia.

Igualmente, la pendiente negativa ($\rho = -0.863$) indica que la reacción de inactivación de los radicales libres se ve favorecida por la presencia de los grupos $-OH$ que actúan como electrodonadores.

Cuadro 2: Datos para aplicar la ecuación de Hammett a los derivados del fenol.

Compuesto	K	σ	AAR
Fenol	$1.29 \cdot 10^{-10}$	0	1
Resorcinol	$1.55 \cdot 10^{-10}$	0.080	0.894
Hidroquinona	$4.46 \cdot 10^{-11}$	-0.461	2.569
<i>p</i> -Hidroxibenzaldehído	$2.19 \cdot 10^{-8}$	2.229	0.322

La linealidad se pierde cuando se incluye en la gráfica al *p*-hidroxibenzaldehído. Miller (2004), ha señalado que la aparición de una curva en la gráfica de Hammett, es consecuencia de cambios en los mecanismos de reacción debidos a efectos electrónicos producidos por los sustituyentes.

En este caso hay que señalar que a diferencia de los grupos $-OH$, el aldehído se comporta como un grupo electro atrayente, debido al déficit de electrones en el grupo carbonílico y, como resultado, se hace más difícil la estabilización del electrón solitario en el radical libre, ya que se produce un híbrido de resonancia muy inestable que contribuye poco a la estabilización del radical libre.

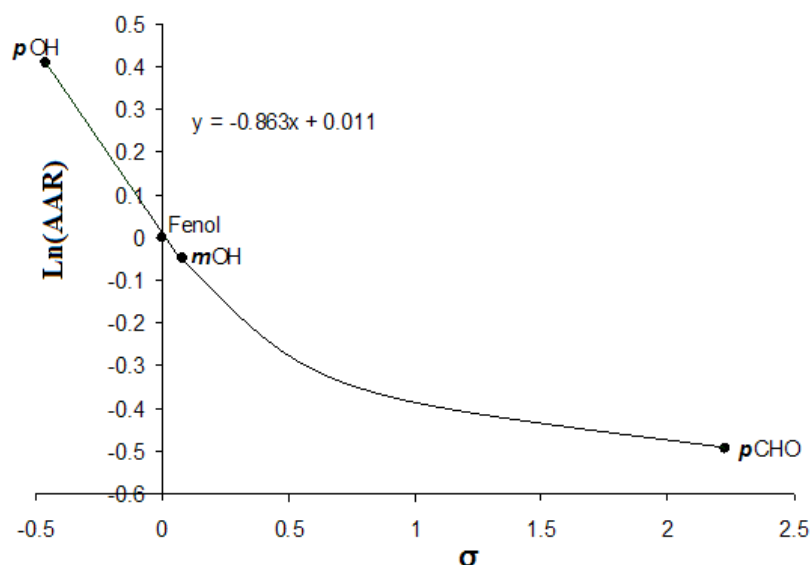


Figura 10 Gráfica de Hammett para el fenol y los isómeros del hidróxifenol.

Conclusiones

Los resultados muestran que el método quimioluminiscente propuesto resulta adecuado para la medición rápida y reproducible de la capacidad antioxidante de compuestos orgánicos, por lo que pudiera ser empleado como un método adicional en el estudio de productos naturales con potencial antioxidante. Asimismo, se ha comprobado que las mediciones quimioluminiscentes son dependientes de las estructuras y reactividades de los distintos compuestos con propiedades antirradicales y, por lo tanto, se puede evaluar la actividad antioxidante a nivel molecular.

Esto demuestra que el método propuesto puede ser utilizado en los cursos de fisicoquímica orgánica para estudiar el comportamiento antirradical de distintas moléculas orgánicas, que luego deben ser interpretados por medio de las relaciones entre las estructuras moleculares y la reactividad química.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Conserjería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha por el financiamiento a través del proyecto PCI-08-0120.

Referencias

- Atanassova, D., Kefalasa, P., Psillakis, E. (2005). Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence. *Environment International* **31**: 275 – 280
- Carey, F. and Sundberg, R. (2007) *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*. 5th. Edition. Springer, USA pp 125-169
- Dapkevicius, A., van Beek, TA., Niederlander, H., de Groot, A. (1999). On-Line detection of antioxidative activity in High-Performance Liquid Chromatography eluates by chemiluminescence. *Analytical Chemistry* **71**: 736 -740
- Giokas, D., Vlessidis, A., Evmirdis, N. (2007). On-Line selective detection of antioxidants free-radical scavenging activity based on Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence by flow injection analysis. *Analitica Chimica Acta* **589**: 56-65
- Miller, B. (2004) *Advanced Organic Chemistry: Reaction and Mechanisms*. 2nd Edition. Pearson Education. USA pp. 129-141
- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, P., Kefalas, P. (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal Pharmacology Toxicology* **44**: 507– 512
- Son, S. and Lewis, B. (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 468-472

AUTORES

José Antonio Murillo Pulgarín,

E: mail: joseantonio.murillo@uclm.es

Luisa Fernanda García Bermejo

E mail: luisafernanda.garcia@uclm.es

Universidad de Castilla - La Mancha, Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas,
Grupo de Investigación en Quimioluminiscencia Molecular.
Ave. Camilo José Cela N° 10, Ciudad Real, España.

Armando Carrasquero-Durán

Universidad Pedagógica Experimental Libertador, Departamento de Química, Núcleo de
Investigación en Didáctica de las Química. Maracay, Estado Aragua. Venezuela.

E mail: acarrasquero@gmail.com.