

Método ORAC y su aplicación en la determinación de la capacidad antioxidante de bebidas fermentadas

ORAC method and its application in the determination of the antioxidant capacity of fermented beverages

Carlos Zapata

Químico Farmacéutico, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Colombia

Paola Zapata*

Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. PhD en Biología con énfasis en biotecnología, docente Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Colombia

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

Vol. 121 (Num. Esp. 2), 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 01/08/2022

Aprobación: 12/08/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546007/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e097>

*Autor de correspondencia: zapatad.carlos@uces.edu.co



Resumen

La presencia de especies reactivas de oxígeno generan daños y estrés oxidativo, al haber producción y eliminación de estas especies en el organismo se presentan situaciones patológicas y de envejecimiento, estas especies pueden ser controladas mediante agentes reguladores como lo son sustancias antioxidantes de bajo peso molecular, lo cual conlleva a generar un protocolo de una metodología de evaluación antioxidante que sea fácilmente reproducible bajo las condiciones del laboratorio de análisis instrumental de la Universidad CES. ORAC es un método ampliamente utilizado para analizar la capacidad antioxidante, pero es un método altamente sensible y posee factores que puede presentar alteraciones si no se tienen estándares bien estipulados generando fluctuaciones en la lectura o proporcionando datos que no sean válidos. Por lo tanto, se estandarizará el método bajo los parámetros estipulados por las Buenas Prácticas de Fabricación (PAF), obteniendo resultados satisfactorios en términos de especificidad para el análisis de compuestos antioxidantes hidrosolubles, robustez de $\pm 10\%$ para el análisis antioxidante de L-Ácido Ascórbico, precisión y exactitud, se realizarán más ensayos para obtener resultados óptimos de linealidad en términos de test de linealidad y proporcionalidad.

Palabras clave: métodos analíticos, radicales libres, alimentos, actividad biológica

Abstract

Presence of reactive oxygen species generates damage and oxidative stress, since production and elimination of these species in the organism presents pathological and aging situations, these species can be controlled by regulatory agents such as low molecular weight antioxidant substances, which leads to generate a protocol of an antioxidant evaluation methodology that is easily reproducible under the conditions of the instrumental analysis laboratory of the CES University. ORAC is a widely used method to analyze the antioxidant capacity of substances, but it is an overly sensitive method, and it has factors that can present alterations if there are not well-stipulated standards generating fluctuations in the reading or providing data that are not valid. Therefore, the method was standardized under the parameters stipulated by the Good Manufacturing Practices (PAF), obtaining satisfactory results in terms of specificity for the analysis of water-soluble antioxidant compounds, robustness of $\pm 10\%$ for the antioxidant analysis of L-Ascorbic Acid, precision and accuracy, more tests will be carried out to obtain optimal linearity results in terms of linearity and proportionality tests.

Keywords: analytical methods, free radicals, foods, biological activity

INTRODUCCION

Los antioxidantes, son micronutrientes de origen natural o sintético con la capacidad de captar radicales libres o también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), siendo estas últimas sustancias que poseen electrones desapareados en su último nivel de energía, las cuales tienen la capacidad de existir de forma independiente sin la necesidad de estar unido a cualquier otro compuesto. Son generadas por el propio metabolismo oxidativo celular (Figura 1), por la exposición a agentes químicos mutagenos o radiaciones ionizantes (rayos X, rayos UV, rayos gamma, etc.), ocasionando desequilibrios a nivel electrónico al estar de forma constante cediendo o atrayendo electrones de otras moléculas presentes en el entorno, ocasionando reacciones de óxido reducción, originando situaciones de estrés oxidativo y generando trastornos a nivel celular (García et al., 2004; Lobo et al., 2010) como:

- Mutaciones del material genético (Modificación a nivel de las bases nitrogenadas por mutagenos endógenos por la oxidación de las bases nitrogenadas o la ruptura de una de las hebras de DNA).

Peroxidación de lípidos: los lípidos que componen la membrana celular son sometidos a metabolismo oxidativo, generando peróxidos que darán lugar a una reacción en cadena presentándose pérdidas de ácidos grasos insaturados.

- Producción de enlaces cruzados en proteínas por la formación de enlaces disulfuro (Sheikh et al., 2012; Pacifico et al., 2013).

Existe una gran variedad radicales libres producidos por el metabolismo celular por medio de diversas rutas de síntesis como el Sistema NADPH Oxidasa, el cual es un complejo proteico encargado de producir ROS como un sistema de defensa o eliminación de sustancias, al igual que la Glicoxidación que involucra reacciones de oxido-reducción de azucares en el entorno celular para la producción de energía, de la misma manera cuando existe un desbalance en el metabolismo de ácidos grasos mediada por adipocitoquinas (proteínas de señalización celular lipídica) y lipoproteínas de alta y baja densidad (LDL-HDL). Estas rutas son sistemas de regulación antioxidante generado por el propio organismo, sin embargo cuando existen anomalías en este, comienzan a generarse ROS y RNS sin control llevando a lesiones a nivel celular al generar radicales libres como: Triclorometil (CCl.), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Hidroxilo (OH^{\cdot}), Peroxilo (ROO), Óxido nítrico (NO), ácido Hipocloroso (HOCl), entre otros (Kumar et al., 2003; Djordjević, 2004; Fagali, 2011).

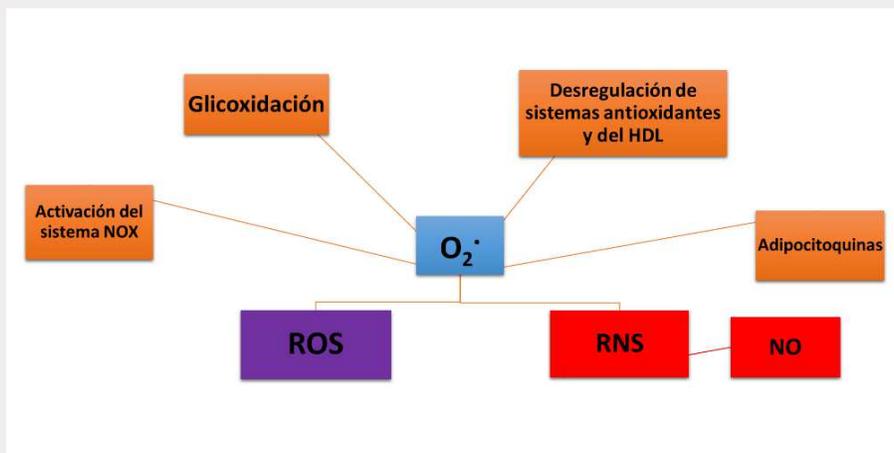


Figura 1

Procesos de síntesis de radicales libres ROS Especies reactivas de oxígeno y RNS especies reactivas de Nitrógeno.

TIPOS DE RADICACES LIBRES

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Especies generadas por las reacciones de Oxido-Reducción de procesos fisiológicos normales como la respiración celular (Llesuy et al., 2001; Serra et al., 2016), ocurre una reducción del oxígeno molecular por medio de la adición de cuatro electrones para generar una molécula de agua. Durante este proceso se producen sustancias tóxicas intermedias a bajas concentraciones como: Radicales del Ion superóxido (generado principalmente por la actividad de oxidasas intracelulares como la xantina oxidasa) y radicales hidroxilos. Estas especies también pueden ser generadas por reacciones intracelulares mediadas por metales de transición como el Hierro (Fe) y el Cobre (Cu) que poseen la capacidad de ser donadores o aceptores de electrones como en la reacción de Fenton. Esta reacción sintetiza el radical hidroxilo, generando una actividad sinérgica entre el hierro y este radical libre, provocando lesiones a nivel oxidativo, originando respuestas fisiológicas o una inducción de una respuesta estresante, llevando a la generación de RNS, reacciones inmunes o la muerte celular (Djordjević, 2004).

METODOLOGIAS DE EVALUACION ANTIOXIDANTE

La generación de radicales está directamente relacionada con la oxidación de lípidos y sustratos biológicos, por ende, la presencia de estas especies reactivas conlleva a daños estructurales y estrés oxidativo, al haber producción y eliminación de especies ROS y RNS. Estas especies pueden ser controladas mediante agentes reguladores como lo son sustancias antioxidantes de bajo peso molecular, por lo tanto, es importante la búsqueda de métodos para la determinación del secuestro de especies radicales.

Según Sánchez-Moreno, C. (2002), existen diversas metodologías para medir la capacidad de barrido de radicales libre tales como: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ABTS, DPPH, DMPD, etc (Kuskoski et al., 2005; Rojano et al., 2008, 2012; Dorta et al., 2017).

Debido a la gran diversidad de técnicas mencionadas anteriormente, puede analizarse la capacidad antioxidante de diversas sustancias y productos, pero debido a la gran heterogeneidad de tipos de radicales libres y antioxidantes que existen no se ha encontrado un método que pueda aglomerar todas aquellas características para analizar tal diversidad de muestras. ORAC es el método analítico más implementado para el análisis antioxidante debido a su adaptabilidad a la gran variabilidad de especies radicales y a las condiciones de diversos laboratorios, además de que se realiza bajo condiciones similares a las fisiológicas y con el anión superóxido que es un radical con alta relevancia biológica. A pesar de su alta adaptabilidad ORAC es un método altamente sensible, específicamente en ciertos factores que pueden presentar alteraciones al momento de realizar el análisis y se generen fluctuaciones en la lectura o proporcionar datos que no sean válidos. Por lo tanto, se pretende estandarizar el método ORAC (Fagali, 2011; Zapata et al., 2014), debido a que este es un método que es conocido a nivel mundial y que es altamente sensible, además posee una gran adaptabilidad a las condiciones de laboratorio. En el desarrollo del protocolo ORAC, se encuentran determinadas características que pueden ser críticas al momento de realizar un análisis como: Rangos de longitudes de onda, volúmenes en cada uno de los Microposos, homogenización de reactivos por agitación, temperatura, tiempo máximo de lectura y oxidación de la fluoresceína.

La generación de un protocolo estandarizado, teniendo en cuenta estas características y las condiciones de Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad CES, brinda una herramienta para el análisis de actividad antioxidante de una gran diversidad de sustancias, brindando resultados confiables y reproducibles.

MECANISMO ORAC

El “apagamiento” de radicales peroxilo por parte de moléculas con actividad antioxidante presentes en las matrices de las muestras analizadas, se evidencia a través de la inhibición de la oxidación de una molécula blanco (fluoresceína (FL)). Dicha inhibición corresponde al aporte que colectivamente hacen a la actividad antioxidante el conjunto de moléculas con capacidad apagadora de radicales Peroxilo presentes en una muestra, esto es, tanto polifenoles como otros compuestos de naturaleza no-polifenólica (Dorta et al., 2017; Kuskoski et al., 2005). Esto último permite medir la actividad antioxidante de alimentos con una composición altamente diversa, en términos de la naturaleza química de las moléculas que definen sus propiedades antioxidantes (Figura 2). Los radicales peroxilo interactúan con sondas fluorescentes,

originando productos no fluorescentes (Amorati & Valgimigli, 2015; Chacón & Alejandra, 2015; Prior et al., 2005).

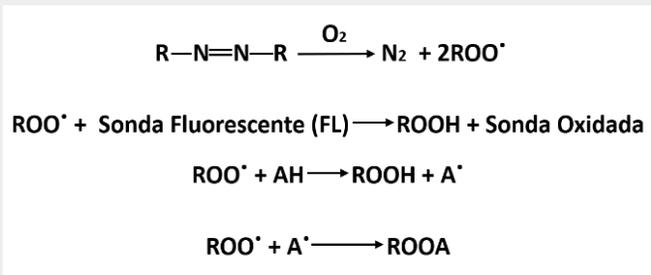


Figura 2
Mecanismo de reacción de un ensayo ORAC

El uso de azoderivados como el AAPH, que contiene grupos funcionales de R-N=N-R', donde un mol de AAPH, pierden un mol de N, generando radicales AAPH•, estos últimos al estar en soluciones saturadas de aire, interaccionan rápidamente con el oxígeno molecular (O₂) dando como resultado la síntesis de radicales peroxilo (2ROO•) y por calentamiento estos interactúan con las sondas fluorescentes (fluoresceína) generando una transferencia de hidrogeniones (H.), originando productos no fluorescentes. Los antioxidantes seden hidrogeniones a los radicales libres, enlazando los electrones desapareados del radical y transformando al antioxidante en un radical libre el cual se mezcla con otro radical peroxilo y por medio de reacciones rápidas se retiran los radicales de ambos compuestos .

PARÁMETROS IMPORTANTES AL MOMENTO DE REALIZAR UN ENSAYO ORAC

Al momento de realizar este tipo de análisis, deben tenerse en cuenta determinados parámetros que llegan a ser determinantes en el mismo, tales como:

- Rangos de longitudes de onda de emisión y excitación al momento de programar el equipo.
- Temperatura de la microplaca al interior del equipo.
- Volumen de reactivos en cada uno de los micropozos, debido a que el volumen de los micropozos puede generar una gran variabilidad en los resultados
- Agitación para la homogenización de la muestra, debido a que la homogenización de los reactivos en cada uno los micropozos para que puedan generarse cada una de las reacciones
- Definir un tiempo de seguimiento para la cinética de reacción, se debe conocer en qué periodo de tiempo se genera la pérdida de fluorescencia total de la concentración más alta del estándar.

REACTIVOS Y MATERIALES

REACTIVOS

El compuesto fluorescente que debe implementarse es la fluoresceína sódica (FL) 3',6'-dihidroxi- espiro [isobenzofuran-1(3H)9(9')-xat en]-3-ona. El agente oxidante llamado AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropano hidrocliclorida)), estándar antioxidante Trolox^R ((Tx) Análogo de la vitamina E) de Sigma Aldrich.

Todas las disoluciones para implementar este tipo de ensayos deben presentar un pH 7,4 debido a que deben encontrarse en condiciones de pH fisiológico y simular las condiciones del entorno intracelular, para ello es necesario preparar una solución buffer fosfato. Se requiere Fosfato dibásico de potasio (K.HPO₄) y Fosfato monobásico de Potasio (KH₂PO₄). Además de aquellas muestras a las que se les desea cuantificar su capacidad antioxidante deben estar en un estado seco (Amorati & Valgimigli, 2015; Prior et al., 2005; Zapata et al., 2014).

MATERIALES

Un ensayo ORAC, debe ser realizado en una microplaca de fondo negro de 96 micropozos. Para un desarrollo óptimo del proceso, las disoluciones deben prepararse el mismo día que se realizara el ensayo para evitar la degradación de los compuestos que las componen. Para preparar las soluciones de AAPH y FL, se recomienda la implementación de tubos cónicos de 15 mL, tubos cónicos de 2mL para las disoluciones de Tx y de los compuestos a los cuales se desea medir su capacidad antioxidante, frascos de vidrio color ámbar para el almacenamiento del buffer de Fosfatos pH 7,4. Debido a la fotosensibilidad y la estabilidad de las soluciones presentes en los tubos, se recomienda cubrirlos de la exposición a la luz para prevenir la generación de datos erróneos en la lectura. Todos los análisis se realizan en un espectrofluorímetro marca BIOTEK.

METODOLOGIA

Preparación de soluciones stock y soluciones de trabajo:

- **Soluciones Stock:** soluciones que poseen una alta concentración de uno o varios compuestos y/o reactivos químicos conocidos y pueden almacenarse por un periodo determinado de tiempo.

- **Soluciones de Trabajo:** soluciones que se preparan diariamente para el desarrollo del ensayo.

Buffer de Fosfatos: buffer isotónico, de osmolaridad que simula las condiciones del pH fisiológico (pH 7,4) y con bajos índices de citotoxicidad.

Para preparar el buffer de Fosfatos con un pH 7,4 se recomienda que esté presente una concentración de 75 mM en fosfatos. Como este buffer presenta un equilibrio ácido-base, debe presentarse una concentración de 46 mM K.HPO. y una concentración de 29 mM KH.PO.. La solución está compuesta por 8,0123 g/L de K.HPO. y 3,9466g/L de KH.PO.disueltos en agua desionizada en un balón volumétrico (Dudonné et al., 2009).

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO

- **Solución de AAPH:** pesar 1,4238 gr de AAPH y disolverse en 7,5 mL del Buffer de Fosfato. Generando como resultado una solución de AAPH con una concentración de 700 mM.

- **Disolución de FL:** debe prepararse una solución de 40 nM. Se toman 14 μ L de FL a 1mM y aforar hasta 14 mL en un tubo Falcón generando una solución 1 μ M de FL. De la solución anterior, se toma una alícuota de 0,56 mL y se afora hasta un volumen de 14 mL en segundo tubo, dando como resultado una solución de FL a 40 nM.

Disolución de Tx: En un tubo cilíndrico, pesar 0.00100g de Trolox y disolver en 2mL de buffer fosfato, dando como resultado una solución de Tx 2mM. Preparar una solución 200 μ M tomando 0.200 mL en tubo Eppendorf y llevar a volumen de 2 mL con buffer pH 7,4.

Tomar cinco tubos, y a partir de la disolución de 200 μ M, tomando los siguientes volúmenes: 1 mL, 0,5 mL; 0,25mL; y 0,125mL en cuatro tubos y aforar hasta 2mL con buffer fosfato, generando soluciones con concentraciones de: 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, y 12.5 μ M. En el último tubo se agregan 0,125 mL de la solución de 100 μ M y aforar hasta 2 mL con buffer fosfato, dando como resultado una solución con una concentración de 6,25 μ M (Dudonné et al., 2009; *Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010): USDA ARS, n.d.*).

METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

Con la preparación de cada una de las soluciones mencionadas anteriormente, se adiciona en cada micropozo 25 μ L de la solución con antioxidante (Trolox o muestra). El punto de oxidación natural de la FL debe determinarse mediante la adición de únicamente 25 μ L de solución de buffer fosfato (blanco), luego adicionar en cada micropozo 150 μ L de la solución FL 40nM. Una vez realizadas estas acciones se procede a agitar e incubar a 37°C por 10 minutos. Finalizada la incubación agregar 25 μ L de la solución de AAPH 700mM (Es recomendable realizar este proceso en un periodo corto de tiempo y minimizar en lo posible el tiempo de exposición directa a la luz de cada una de las soluciones) y se procede a realizar la lectura de la fluorescencia en cada uno de los micropozos correspondientes mediante espectrofotometría de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 495 nm y emisión de 520 nm, por un periodo de tiempo de 34 minutos con intervalos de lectura de 2 minutos.

METODOLOGIA DE ESTANDARIZACION Y RESULTADOS

El método se estandarizó de acuerdo los parámetros establecidos, en la Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) (Chaloner-Larsson et al. 1997) y por la AEFI (Ortega et al. 2001), en términos de linealidad, precisión y exactitud, especificidad y robustez.

Linealidad: este término hace referencia a la proporcionalidad entre las concentraciones del analito y la respuesta de este frente al método implementado, para la determinación de un intervalo entre la concentración mínima y máxima del analito para el método implementado y efectuar la interpolación de este por medio de una curva de calibración estándar. Para este método se realizaron 5 curvas de calibración de Tx con cada una de las concentraciones mencionadas anteriormente y su capacidad de evitar la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína (Tabla 1 – Figuras 3 y 4).

Realizadas dichas acciones, se calculó el área bajo la curva (ABC) de cada una de las reacciones y se normalizó cada una de estas, para la obtención de áreas bajo la curva relativas (ABCR). Debido a que comportamiento presentado por el decaimiento de la fluorescencia no es lineal, los datos deben normalizarse con el mínimo valor del área del blanco FL + AAPH + Buffer y el máximo valor del área en cuestión mediante la siguiente ecuación:

$$\left[\text{AUC}_{\text{FL} + \text{TX} [\]} - \text{AUC}_{\text{FL} + \text{AAPH}} \right] / \left[\text{AUC}_{\text{FL}} - \text{AUC}_{\text{FL} + \text{AAPH}} \right]$$

Donde:

AUC_{FL + TX []}: Área Bajo la Curva de muestras de Trolox en sus diversas concentraciones.

AUC_{FL + AAPH}: Área Bajo la Curva de blanco de Fluoresceína + AAPH.

AUC_{FL}: Área Bajo la Curva de blanco de Fluoresceína.

En la tabla 1 se especifican los parámetros necesarios de cada ecuación lineal para cada una de las 5 curvas realizadas, con su respectivo coeficiente de correlación. Se calculó el valor promedio de cada uno de los parámetros evaluados y su desviación estándar. Se eligió la curva 5 como curva estándar para la evaluación de unidades ORAC de sustancias problema. Esta elección se realizó teniendo como fundamentos el coeficiente de correlación.

Curva	y= ax + b		R ²
	A	b	
1	0,007	0,3782	0,9079
2	0,006	0,1313	0,9091
3	0,0083	0,0533	0,9405
4	0,0089	0,0674	0,9404
5	0,0075	0,1488	0,9682
\bar{x}	0,0075	0,1558	0,9332
S ²	0,001	0,131	0,025

Tabla 1
Ecuaciones de regresión lineal para cada curva de calibración de Tx.

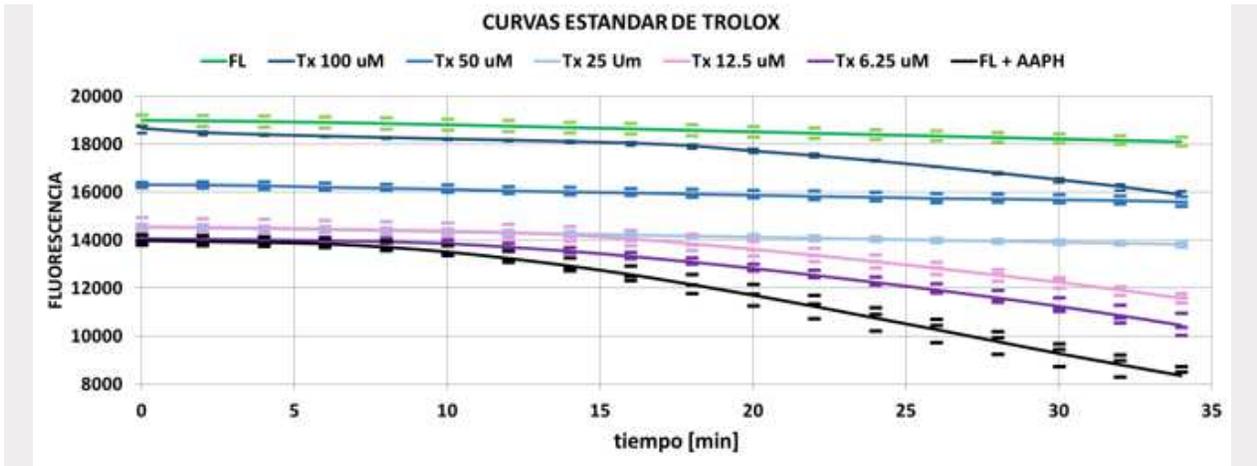


Figura 3

Cinética de oxidación de la FL por acción del AAPH, y la acción del Tx a diferentes concentraciones

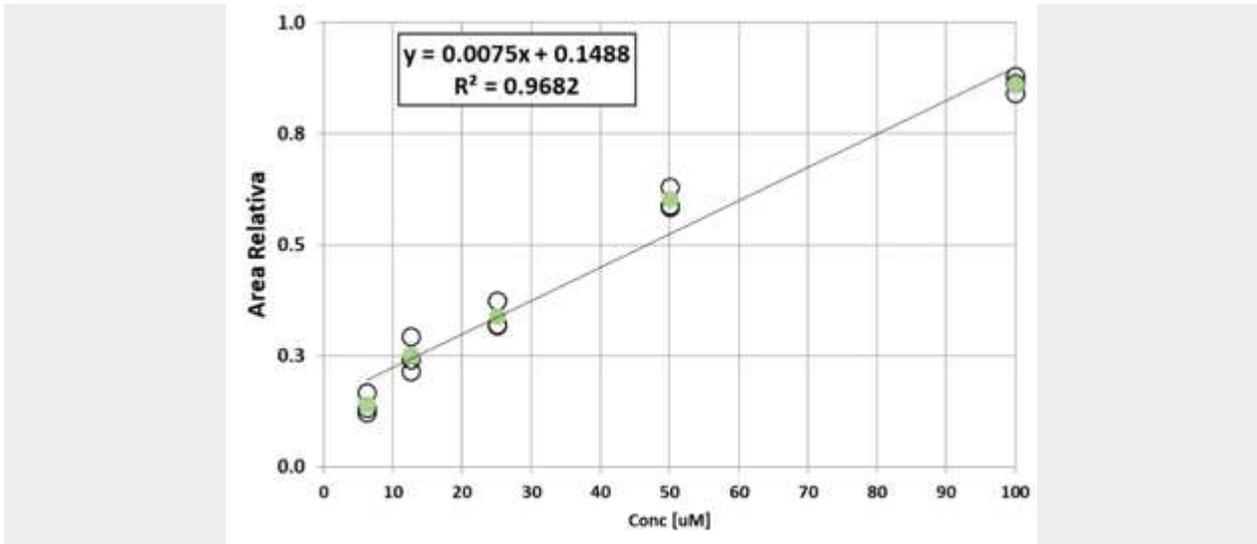


Figura 4

Linealidad de ABCR y concentración de Tx curva número 5.

Precisión y Exactitud: Para determinar la precisión y la exactitud del método ORAC se prepararon tres ensayos, con concentraciones conocida de 12,5µM, 50µM y 100µM y se calculó el área bajo la curva de la gráfica generada en cada uno de los ensayos y se determinó su concentración mediante la curva de calibración de Tx generada el día que se realiza el ensayo. Se calcula la desviación estándar relativa (%DER) y el porcentaje de recuperación (%REC) (Tabla 2). Si la desviación estándar relativa es menor a un 15% se indica que las curvas de calibración poseen una buena precisión y dependiendo de los porcentajes de recuperación se determina la exactitud.

Conc de TX [μM]	ENSAYO 1			ENSAYO 2			ENSAYO 3		
	12,5	50,0	100,0	12,5	50,0	100,0	12,5	50,0	100,0
\bar{x}	16493	16867	17008	17396	17866	18117	18128	17861	17741
S ²	1819,8	1112,1	559,6	2562,2	957,9	132,2	2479,6	1322,4	793,1
%DER	4,37	3,57	3,49	4,58	3,80	3,66	4,23	3,89	3,44
%REC	91,8	96,8	100,8	86,2	111,1	97,6	86,7	94,1	96,0

Tabla 2
Resultados Prueba de Precisión y Exactitud.

Especificidad: Para determinar la especificidad del método ORAC, se implementaron compuestos como L-ácido ascórbico (Vitamina C) y D-α Tocoferol (Vitamina E). El D-α Tocoferol es un compuesto altamente lipofílico que al estar en medios polares no presenta actividad antioxidante por lo cual se espera que los resultados de análisis de la capacidad antioxidante de este compuesto sean negativos (*USP-NF Descripción y Solubilidad Relativa*, n.d.). Por el contrario, el L-ácido ascórbico es compuesto proveniente de un azúcar que posee una alta capacidad antioxidante, sin embargo, dependiendo del medio en que se realicen las pruebas, la capacidad antioxidante de un compuesto puede variar. Se realizaron los ensayos con concentraciones 50μM y 100μM, se generaron las gráficas de las cinéticas de oxidación de FL (Figura 5), se determinaron las ABC y por medio de la curva de calibración de Tx se determinó la capacidad antioxidante de ambos compuestos y por ende la especificidad del método ORAC.

Capacidad Antioxidante de muestras de bebidas fermentadas: Con los parámetros anteriormente descritos se evaluó la capacidad antioxidante de dos muestras de bebidas fermentadas, la primera muestra corresponde a un vino de frutos rojos (mezcla de moras, manzanas, fresas y cerezas) y la segunda a un vino de manzana roja. Dichas bebidas fueron elaboradas por los estudiantes del curso de Fundamentos de Biotecnología 2018-02 de la Universidad CES, con una relación de masa-volumen de 6 Kg de fruta en 20 L de agua. Se tomó una muestra representativa de cada una de las bebidas fermentadas, y para su análisis se prepararon soluciones muestra con relaciones V/V de 1:10 y 1:100. Se determinaron las ABC y por medio de la curva de calibración de Tx se determinó la capacidad antioxidante de cada bebida.

Robustez: Este término hace referencia a que tan sensible es el método analítico implementado a mínimos cambios, con respecto a concentraciones, masas, volúmenes y tiempo. Se realizaron análisis de la capacidad antioxidante de L-ácido ascórbico durante 20 días diferentes para observar que tanto varía el análisis de acuerdo con las variaciones que pueden presentarse durante la preparación de cada una de las soluciones utilizadas (Figura 7). Los ensayos se evaluaron con soluciones de Tx en sus diversas concentraciones.

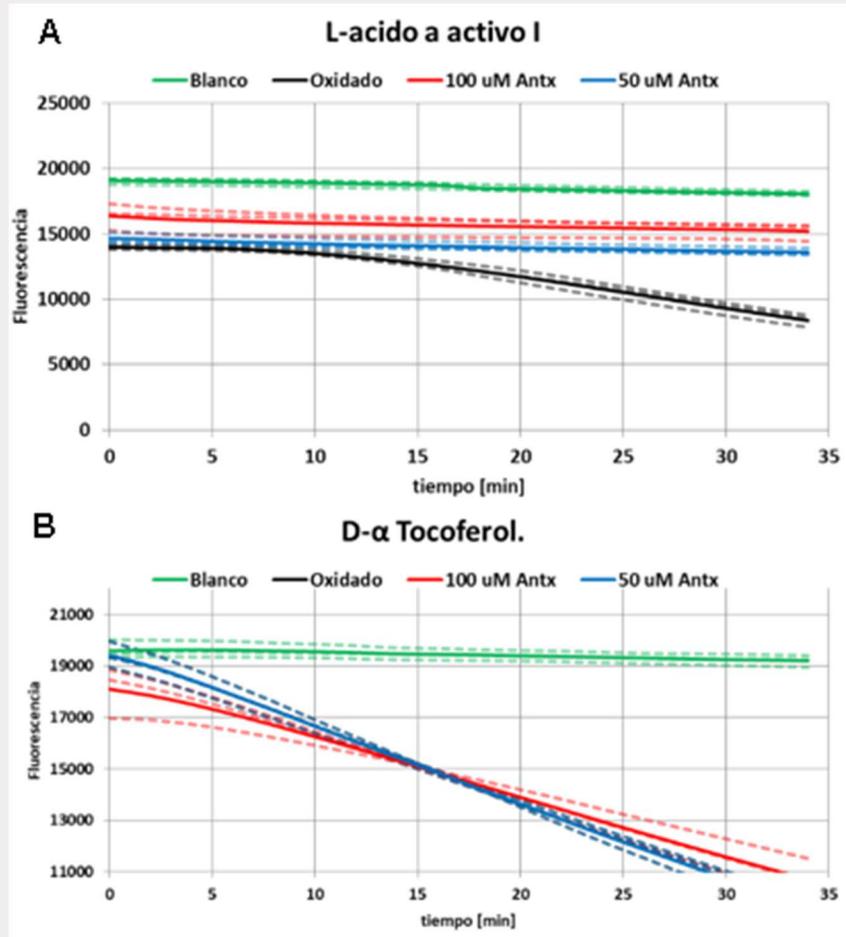


Figura 5

Cinéticas de oxidación de fluoresceína con L-ácido ascórbico y D α Tocoferol. A) Cinética del L-ácido ascórbico B) Cinética del D α Tocoferol.

DISCUSIÓN

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el método se estandarizó bajo los parámetros establecidos, en la Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) y por la AEFI en términos de linealidad, precisión y exactitud, especificidad y robustez (Tabla 3- Tabla Resumen de Parámetros de Estandarización), cada una con su respectivo análisis estadístico.

LINEALIDAD

Con respecto al término de linealidad, se realizaron 5 curvas de calibración, se determinó la ecuación lineal y coeficientes de correlación y determinación (r^2 y r) para cada una de ellas. Se eligió la curva 5 como curva estándar para la evaluación de unidades ORAC de sustancias problema. Esta elección se realizó teniendo como fundamentos el coeficiente de correlación.

Para la prueba de linealidad se halló el coeficiente de variación (%CVf) para el factor de respuesta f ; el valor de t de Student para la pendiente y la variable independiente (test de linealidad y proporcionalidad).

Sin embargo, se realizarán más ensayos para determinar una linealidad óptima y pueda cumplirse este requerimiento, teniendo en cuenta los parámetros estipulados los capítulos generales de la USP (United States of America Pharmacopeia) <41> Balanzas y <1251> Pesada en una Balanza Analítica (USP-NF <41> Balanzas, n.d.; USP-NF <1251> Pesada En Una Balanza Analítica, n.d.), en los cuales se menciona que en una balanza analítica no es recomendable pesar una cantidad menor de $5,0 \text{ mg} \pm 0,5$; debido a que al pesar cantidades tan pequeñas pueden presentarse variaciones analíticas debido a las incertidumbres de las balanzas analíticas utilizadas, afectando el análisis en términos de linealidad y proporcionalidad, se espera que en futuros análisis teniendo en cuenta estas modificaciones se cumplan con todos los parámetros estipulados.

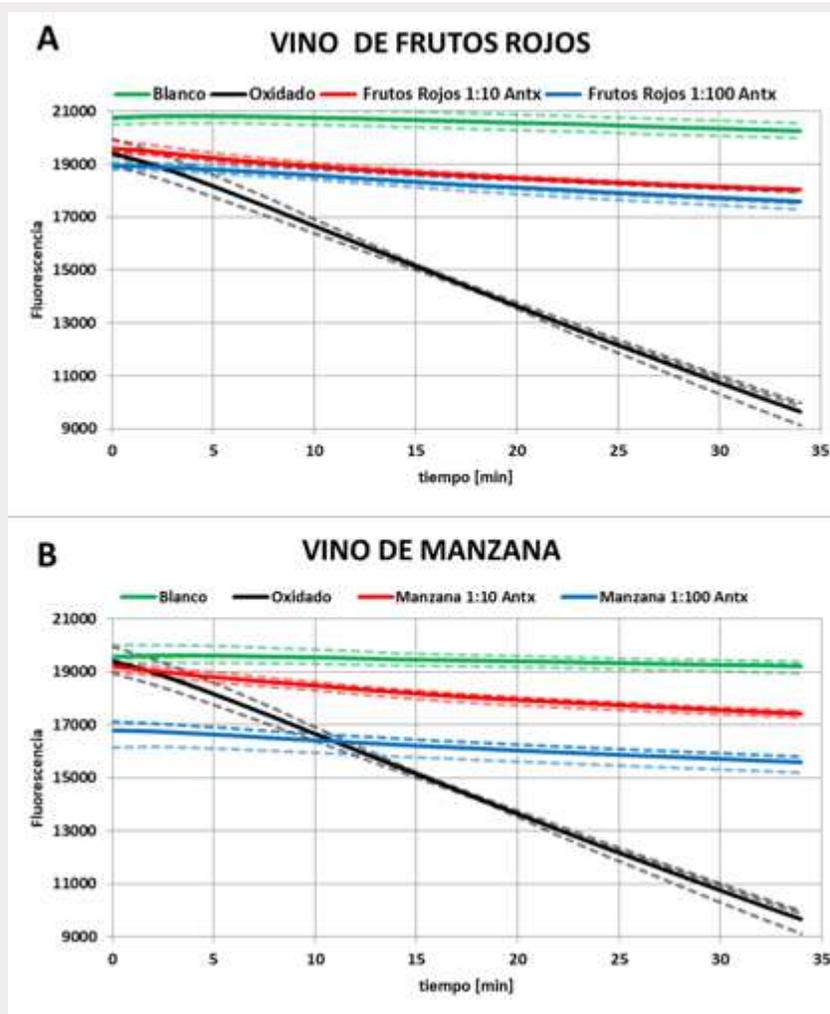


Figura 6

A) Cinética de Oxidación de FL por acción del AAPH en presencia de muestra de Vino de Frutos Rojos.
B) Cinética de Oxidación de FL por acción del AAPH en presencia de muestra de Vino de Manzana.

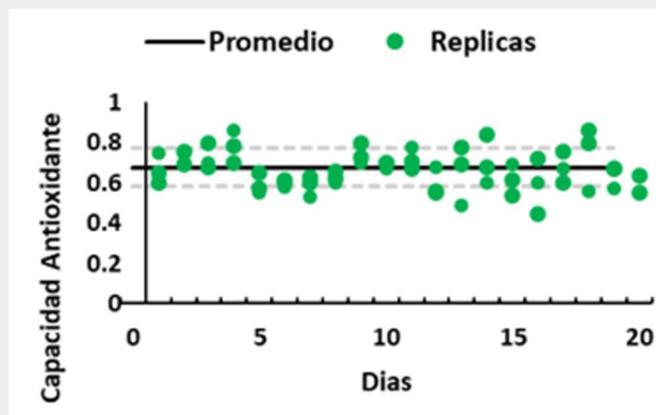


Figura 7

Robustez del ensayo ORAC para el L-ácido ascórbico. En líneas continuas se muestra el valor promedio y el margen de $\pm 10\%$ en exactitud.

PRECISIÓN Y EXACTITUD

Mediante los datos obtenidos con las pruebas de Precisión y Exactitud, se pudo observar que el método ORAC posee una alta capacidad para determinar la concentración con una baja dispersión y variabilidad analítica al momento de realizar el análisis de un analito específico que en este caso fue la fluoresceína (Conservación de la Fluorescencia).

Debido a que si la desviación estándar es menor a un 15% se indica que las curvas de calibración poseen una buena precisión y dependiendo de los porcentajes de recuperación se determina la exactitud (Ou et al., 2001). Se calcularon los %CV de repetibilidad y reproducibilidad para cada una de las concentraciones estipuladas para el estudio y se obtuvieron resultados menores a un 5%.

La exactitud del método se evaluó mediante el uso de prueba T student teniendo como criterio de aceptación que $t_{exp} < t_{tab}$, obteniendo como resultado para $t_{tab} = 2,84$ y un $t_{exp} = 2,61$; indicando que el método cumple con los criterios de exactitud requeridos.

ESPECIFICIDAD Y ROBUSTEZ

Al momento de realizar los ensayos se encontró que el D- α Tocoferol al ser un analito liposoluble, que al estar en medios polares como lo es el buffer PBS no presenta una actividad antioxidante que pueda ser cuantificada, presentándose resultados negativos para dicha actividad. Por el contrario, el ácido ascórbico es un compuesto que se disuelve fácilmente en medios polares por lo cual es fácilmente detectable su actividad antioxidante bajo las características con la que se ha estipulado y estandarizado el método en cuestión. Además al momento de realizar los análisis se determinó que los componentes de las soluciones implementadas no presentan interferencia con el análisis de componentes antioxidantes, esto se demostró mediante la siembra de blancos de Buffer PBS, AAPH, Tx y muestras problema, sin la presencia de solución de fluoresceína en los mismos, como una forma de demostrar que la fluorescencia que puedan aportar este componentes al análisis no sea una fuente de variación analítica o para la obtención de datos errados.

Se evaluó la actividad antioxidante del L-ácido ascórbico bajo las mismas condiciones a las que se evaluó el D- α Tocoferol en las mismas concentraciones. Como este compuesto es altamente hidrosoluble, por lo cual ejerció una actividad antioxidante sobre la FL impidiendo la oxidación de esta por acción del AAPH. Se calculó el ABC y haciendo uso de la curva de calibración de Tx, se determinó que este compuesto presenta una capacidad de equivalencia a Tx de $1,30 \times 10^8 \mu\text{M}$ por gramo de ácido ascórbico, lo cual equivale a un 70,21% de la capacidad antioxidante del Trolox.

De acuerdo con los análisis realizados con el L-ácido ascórbico, se continuó evaluando la capacidad antioxidante de este mismo compuesto durante 20 días consecutivos para observar las variaciones analíticas que pueden presentarse al momento de realizar dicho análisis con determinadas variables (pesos, pH de la solución buffer PBS, tiempos de agitación). Durante los 20 días de análisis, se observó

que el comportamiento de la capacidad antioxidante tiende a variar en $\pm 10\%$ al presentarse variaciones en cada una de las variables mencionadas anteriormente, por lo cual se concluye que el método ORAC, es un método idóneo y lo suficientemente robustos para el análisis de la capacidad de compuestos antioxidante de naturaleza hidrosoluble. Por lo tanto, se considera pertinente el montaje de la estandarización de la técnica ORAC-L, lo cual se basa en el mismo fundamento de análisis que el método descrito en este trabajo, sin embargo, presenta determinadas modificaciones que permite realizar el análisis de componentes antioxidantes de naturaleza lipofílica, de una manera óptima y eficiente.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MUESTRAS DE BEBIDAS FERMENTADAS

Se calculo la capacidad antioxidante de cada una de las muestras de vino y se determinó que el vino de frutos de rojos al ser una mezcla fermentada de frutas con capacidad antioxidante se encontró que esta tiene una equivalencia a Trolox de $1,89 \cdot 10^6$ lo cual corresponde a un 1,18% de la capacidad antioxidante del Trolox. Se realizó el mismo procedimiento con el vino de manzana y este presenta una equivalencia a Trolox de aproximadamente $1,61 \cdot 10^6$ que corresponde a un 1,01% de la capacidad de la capacidad antioxidante del Trolox. Con los datos obtenidos puede determinarse que la mezcla de frutos rojos tiene una capacidad antioxidante mayor que la del vino que únicamente contiene manzanas como fuente de azúcares para fermentación. Así puede retardar con una mayor capacidad la oxidación de FL en el tiempo, al tener una mayor diversidad y concentración de compuestos que presenten capacidad antioxidante de los compuestos hidrosolubles presentes en la matriz de cada una de las muestras evaluadas.

Parámetro	Procesamiento Estadístico	Resultados			Criterios de Aceptación
LINEALIDAD	Coeficiente de correlación y Determinación	$r^2 = 0,9682$ $r = 0,9839$			$r^2 = 0,98$ $r = 0,99$
	Test de Linealidad	3,51 $T_{exp} = 17,91$ $T_{tab} = 2,16$			%CV < 5 $t_{exp} > t_{tab}$
	Test de Proporcionalidad	$T_{exp} = 6,79$ $T_{tab} = 2,16$			$t_{exp} < t_{tab}$
	Ecuación de Regresión	0,0075x + 0,1488			
PRECISION		Conc. Baja	Conc. Media	Conc. Alta	
Repetibilidad y Reproducibilidad	%CV _{repet}	4,39	3,59	2,67	%CV < 5
	%CV _{reprod}	2,80	2,55	2,43	
ROBUSTEZ	Distribución	No se observan diferencias significativas o datos atípicos con respecto al límite superior e inferior de la capacidad antioxidante del L-Acido Ascórbico.			
EXACTITUD	t de Student	$T_{exp} = 2,61$ $T_{tab} = 2,84$			$t_{exp} < t_{tab}$.
ESPECIFICIDAD	Captación de compuestos Hidrosolubles	Captación de capacidad antioxidante	Vitamina C	POSITIVA	
			Vitamina E	NEGATIVA	

Tabla 3
Resumen de Parámetros de Estandarización

CONCLUSIONES

Se estandarizó exitosamente la metodología para la determinación de actividad antioxidante mediante la prueba ORAC en términos de precisión y exactitud, especificidad y robustez, demostrando para la prueba especificidad que el método ORAC desarrollado solo es válido para sustancias hidrosolubles que pueden participar en la cadena oxidativa que se presenta en medio acuoso ya que la presencia de sustancias liposolubles que puedan presentar actividad antioxidante puede verse completamente alteradas en presencia del medio acuoso en que se realiza. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para asegurar de forma óptima el cumplimiento de requerimientos de linealidad y proporcionalidad, al tener en cuenta los lineamientos estipulados por los capítulos generales de la USP para el uso de balanzas analíticas.

Se determinó la capacidad antioxidante de muestras de vino de Frutos Rojos y vino de Manzana. Se cuantificó sus propiedades antioxidantes mediante las unidades ORAC a relaciones V/V 1:10 y 1:100. Comparativamente con el Trolox, este valor corresponde al 1,18% y 1,01% de su propiedad antioxidante respectivamente, indicando que las mezclas de frutas poseen una mayor capacidad antioxidante al encontrarse bajo condiciones de fermentación alcohólica, sin embargo, también pertinente para futuros ensayos realizar el análisis antioxidante de los componentes antioxidantes liposolubles presentes en la matriz de cada una de las muestras para obtener un perfil adecuado de las mismas.

El desarrollo de este tipo de trabajos, en el que se desarrollan técnicas que permiten la obtención de resultados confiables para futuros trabajos, principalmente para el desarrollo y perfilamiento de productos con actividad biológica aplicados en la industria farmacéutica, cosmética y la industria de alimentos.

El uso de metodologías que evalúan la capacidad de barrido de radicales libres deben ser realizadas de forma metódica y cuidadosa debido a que son técnicas que requieren un determinado grado de destreza para poder obtener los resultados que se esperan al evaluar dicha actividad, siendo de alta importancia en el sector farmacéutico, específicamente en las áreas como: alimentos, cosméticos y medicamentos.

Agradecimientos

A la Universidad CES por todo el apoyo, materiales y dedicación a la formación de profesionales en química farmacéutica que reflejan el lema institucional “Un compromiso con la Excelencia”.

A los docentes de la Universidad CES Erika Juliana Obando Montoya Docente Universidad CES PhD. Biotecnología y Diego Fernando Rojas Vahos - jefe de Programa Química Farmacéutica Universidad CES-MSc. Biología, por todas las ayudas, asesorías y tiempo invertido para la realización de este proyecto.

A los tecnólogos- Químicos auxiliares de laboratorio de la Universidad CES, Diana María Carmona y Sergio Álzate por toda ayuda brindada en la organización del laboratorio, espacios y equipos necesarios para la ejecución de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Amorati, R., & L. Valgimigli** (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research* 49(5): 633–649.
- Chacón, V., & M. Alejandra** (2015). Validación de un método para valorar potencial antioxidante (orac—Oxigen radical absorbance capacity).
- Chaloner-Larsson, G., & R. Anderson** (n.d.-a). Primera parte: Procedimientos de operación normalizados y fórmulas maestras. 184.
- Chaloner-Larsson, G., & R. Anderson** (n.d.-b). Segunda parte: Validación. 158.
- Djordjević, V. B.** (2004). Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology* 237: 57–89.
- Dorta, E., Aspée, A., Pino, E., González, L., Lissi, E., & C. López-Alarcón** (2017). Controversial alkoxyl and peroxy radical scavenging activity of the tryptophan metabolite 3-hydroxy-anthranilic acid. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90: 332–338.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & J.-M. Mérillon** (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using

- DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5): 1768–1774.
- Fagali, N. S.** (2011). Peroxidación de diferentes especies lipídicas: Efecto de antioxidantes [Tesis, Facultad de Ciencias Exactas].
- García, Z., E. A., Eirez Izquierdo, M., & M. Izquierdo Expósito** (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: Carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 23(1), 51–57.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & S.L. Robbins** (2003). *Patología humana*. Elsevier España.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & R. Fett** (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)* 25(4), 726–732.
- Llesuy, S., Evelson, P., Campos, A. M., & E. Lissi** (2001). Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review. *Biological Research*, 34(2) 51–73.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & N. Chandra** (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4(8), 118–126.
- Ortega, L., Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, & J. Pérez** (2001). Validación de métodos analíticos. *Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria*.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & R.L. Prior** (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619–4626.
- Pacifico, S., Gallicchio, M., Lorenz, P., Potenza, N., Galasso, S., Marciano, S., Fiorentino, A., Stintzing, F. C., & P. Monaco** (2013). Apolar *Laurus nobilis* leaf extracts induce cytotoxicity and apoptosis towards three nervous system cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 62(C): 628–637.
- Prior, R. L., Wu, X., & K. Schaich** (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4290–4302.
- Rojano, B. A., Gaviria, C. A., & J.A. Sáez** (2008). Antioxidant activity determination in a lipidic peroxidation model of butter inhibited by isoospintanol. *Vitae* 15(2): 212–218.
- Rojano, B. A., Zapata Acosta, K. & F.B. Cortes Correa** (2012). Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17(4): 408–419.
- Sánchez-Moreno, C.** (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* 8(3): 121–137.
- Serra, J. A., Marschoff, E. R., & R.O. Domínguez** (2016). Estrés oxidativo en la enfermedad neurológica. ¿Es causa, consecuencia o induce una forma crónica progresiva? *Neurología* 31(6): 420–421.
- Sheikh, S., Safia, Haque, E., & S.S. Mir** (2012). Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *Journal of Neurodegenerative Diseases* 2013, e563481.
- USDA ARS. (n.d.)** Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2: Retrieved October 31, 2017
- USP-NF (2022)** Descripción y Solubilidad Relativa. (n.d.). Retrieved May 29, 2022, from https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-E124FC65-4846-4731-BB90-913D6A16ED31_18_es-ES?source=Search%20Results&highlight=solubilidades
- USP-NF <1251>** (2022). Pesada en una Balanza Analítica. (n.d.). Retrieved June 5, 2022, from https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-64BFE248-B65C-4D04-9DDE-EBF471C3BF3B_3_es-ES?source=Search%20Results&highlight=BALANZAS%20ANALITICAS
- USP-NF <41> Balanzas. (n.d.). (2022)** Retrieved June 5, 2022, from https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-0778059F-4B53-414F-B496-2195C1D8C7FB_4_es-ES?source=Search%20Results&highlight=BALANZAS%20ANALITICAS
- Zapata, S., Piedrahita, A. M., & B. Rojano** (2014). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic content of fruits and vegetables from Colombia. *Perspectivas en nutrición humana* 16(1): 25–36.