

Estandarización del Método ORAC como Herramienta Básica de Análisis de la Capacidad Antioxidante

Zapata Carlos ^a, Zapata Paola ^b

^a Estudiante Química Farmacéutica, Universidad CES. zapataad.carlos@uces.edu.co.

^b Químico Farmacéutico. Grupo de Investigación en Ciencias Farmacéuticas ICIF-CES. Universidad CES. pazapata@ces.edu.co

Resumen. La presencia de especies reactivas de oxígeno puede ser controlada mediante el uso de agentes reguladores como lo son las 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 método ampliamente utilizado para analizar la capacidad antioxidante de sustancias, 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. Para la estandarización y validación implementaron los parámetros estipulados en la Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) alcanzando resultados de linealidad de 0.9682, precisión y exactitud con un coeficiente de variación menor al cinco por ciento ($\%CV < 5$), una robustez de $\pm 10\%$ y una especificidad por compuestos de naturaleza hidrofílica, demostrando que el método ORAC es apto para su aplicación bajo condiciones específicas de trabajo, y se evaluó la capacidad antioxidante de bebidas fermentadas elaboradas a partir de diversas mezclas de frutas con una capacidad antioxidante equivalente a Trolox entre 30% y 60%.

Palabras Clave: Estandarización, ORAC, Métodos Analíticos, Capacidad Antioxidante, Radicales Libres.

Abstract: The presence of reactive oxygen species can be controlled using regulatory agents such as low molecular weight antioxidant substances, which leads to the generation of a protocol for an antioxidant evaluation methodology that is easily reproducible under laboratory conditions. instrumental analysis of the CES University. ORAC is a widely used method to analyze the antioxidant capacity of substances, but it is a highly 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. For standardization and validation, they implemented the parameters stipulated in the WHO Guide on Requirements of Good Manufacturing Practices (FAP), achieving linearity results of 0.9682, precision and accuracy with a coefficient of variation of less than five percent. a robustness of $\pm 10\%$ and a specificity for hydrophilic compounds, demonstrating that the ORAC method is suitable for application under specific working conditions, and the antioxidant capacity of fermented beverages made from various mixtures of fruits with an antioxidant capacity equivalent to Trolox between 30% and 60%.

Key Words: Standardization, ORAC, Analytical Methods, Antioxidant Capacity, Free Radicals.

1. Introducción

Los antioxidantes son sustancias 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 (**Ver 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 y originando situaciones de estrés oxidativo por ende generando trastornos a nivel celular(1-3) 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 (4).

2. Tipos de Radicales libres

2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Especies generadas por las reacciones de Oxido-Reducción de procesos fisiológicos normales como la respiración celular (5,6), 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 toxicas 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 (7).

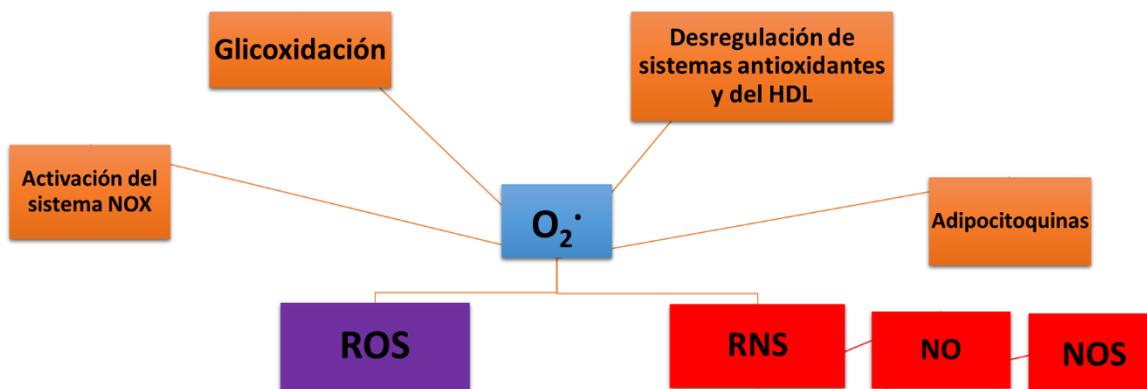


Figura 1. Procesos de síntesis de radicales libres ROS (Especies reactivas de oxígeno) y RNS (especies reactivas de Nitrógeno). Existen una gran variedad radicales libres producidos por el metabolismo del organismo por medio de diversas rutas de síntesis como: Triclorometil (CCl_3), radical superóxido ($\text{O}_2\cdot$), Hidroxilo (OH), Peroxilo (ROO), Óxido nítrico (NO), ácido Hipocloroso (HOCl), entre otros. Todas las especies reactivas de oxígeno participan en cadenas de reactivas de radicales libres (8).

3. Metodologías de evaluación de Actividad 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. 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.

Todos aquellos métodos implementados para la medición de capacidad antioxidante de una sustancia o un compuesto han sido fundamentados desde la

experimentación con sustratos para medir la capacidad antioxidante total en fluidos y muestras biológicas. La metodología para evaluar antioxidantes debe ser analizada de una forma meticulosa y debe interpretarse según el sistema y el método analítico a implementar para determinar la extensión y el punto final de la oxidación. Mediante el uso del sustrato adecuado (9,10), este se somete bajo condiciones de oxidación estándar (dependerá de las características fisicoquímicas del sustrato) y se mide el punto máximo de oxidación del sustrato por métodos químicos, instrumentales y/o sensoriales. Según Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. Food Science and Technology International, 8(3), 121-

137. Existen diversas metodologías para medir la capacidad de barrido de radicales libre tales como: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), ABTS, DPPH, DMPD, etc (9-12).

Debido a la gran diversidad de técnicas mencionadas anteriormente, pueden 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 implementando 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 y en ciertos factores que puede haber alteraciones si no se tienen estándares bien estipulados puede generar fluctuaciones en la lectura o proporcionar datos que no sean válidos. Por lo tanto, se pretende estandarizar el método ORAC, debido a que este es un método que es conocido mundial y 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 ensayo ORAC 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.

3.1 Mecanismo ORAC

El “apagamiento” de radicales Peroxilo por parte de moléculas con actividad antioxidante presentes en las muestras analizadas se evidencia a través de la inhibición de la oxidación de una molécula blanco (fluoresceína). 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 (11). Esto último permite medir la actividad antioxidante de alimentos cuya composición puede ser muy diversa, en términos de la naturaleza química de las moléculas que definen sus propiedades antioxidantes (Ver **Figura 2**). Los radicales peroxilo interactúan con sondas fluorescentes, originando productos no fluorescentes (13-14).

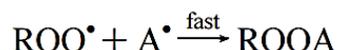
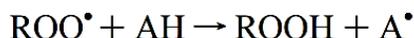
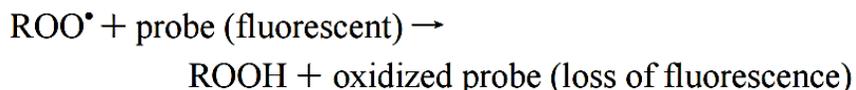
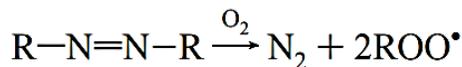


Figura 2. Mecanismo de reacción de un ensayo ORAC. El uso de azoderivados como el AAPH, que son con grupos funcionales de $R-N=N-R'$, que por una mol de AAPH, pierden una mol de N, generando radicales AAPH \cdot , estos últimos al estar en soluciones saturadas de aire, los radicales interaccionan rápidamente con el oxígeno (O_2) dando como resultado la síntesis de radicales peroxilo ($2ROO\cdot$) y por calentamiento estos interactúan con las sondas fluorescentes (fluoresceína) generando una transferencia de hidrogeniones (H^+), originando productos no fluorescentes (7,14,15). Los antioxidantes seden hidrogeniones a los radicales libres, enlazados 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 (16,17).

3.2 Variables importantes al momento de realizar un ensayo ORAC

- Rangos de longitudes de onda de emisión y excitación
- Temperatura de Lectura
- Volumen de reactivos en cada uno de los microporos, debido a que el volumen de los microporos 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 microporos para que pueden 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 perdida de

fluorescencia total de la concentración más alta del estándar.

4. Reactivos y Materiales

4.1 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 hidroclicida)), estándar antioxidante Trolox[®] ((Tx) Análogo de la vitamina E). Todas las disoluciones a implementar para este tipo de ensayos deben presentar un pH 7.4 debido a que encontrarse a condiciones de pH fisiológico y simular las condiciones de un entorno intracelular, para ello es necesario preparar una solución buffer fosfato. Se requiere

Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) y Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4). Además de aquellas muestras a las que se les desea cuantificar su capacidad antioxidante.

4.2 Materiales

Un ensayo ORAC, debe ser realizado en una microplaca de fondo negro de 96 microporos. 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 a un pH de 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.

5. Metodología

Preparación de soluciones de stock y soluciones de trabajo:

- **Soluciones Stock:** soluciones que poseen una alta concentración de uno o varios compuestos y/o reactivos químicos conocidos
- **Soluciones de Trabajo:** soluciones que se preparan diariamente para el desarrollo del ensayo

5.1 Preparación de Soluciones Stock

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

Para preparar el buffer de Fosfatos con un pH 7.4, este debe tener una concentración de 75 mM en fosfatos. Como este buffer presenta un equilibrio ácido base, debe presentarse una concentración de 46 mM K_2HPO_4 y una de concentración de 29 mM KH_2PO_4 . La solución está compuesta por 8.0123 g/L de K_2HPO_4 y 3.9466g/L de KH_2PO_4 disueltos en agua desionizada en un balón volumétrico. Puede prepararse una solución con una concentración de 1 mM al pesar 0.00564 g disueltos con 15 mL del buffer preparado anteriormente en tubo cilíndrico (19).

5.2 Preparación de Soluciones de Trabajo

- **Solución de AAPH:** deben pesarse 1.42375gr 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 mediante la implementación de disoluciones sucesivas. 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 extraen 0.56 mL de solución y se afora hasta 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, mediante esta solución madre se preparan doce disoluciones cada de una de 200 μ M. De

la solución madre se toman 0.164 mL y disolver junto con la disolución de FL y aforar a un volumen de 2 mL en un segundo tubo.

Tomar cinco tubos, y a partir de la disolución de 200 μ M, tomando los siguientes volúmenes 1mL, 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. Siendo este paso un factor crítico en la formación de la curva de calibración a partir de las cinco concentraciones estipuladas (24).

Con la preparación de cada una de las sustancias 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 25 μ L de solución de buffer fosfato, 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 la microplaca, para que pueda presentarse una correcta homogenización de los reactivos en cada uno de los reactivos en cada uno de los micropozos. 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 fluoresceína en cada uno de los micropozos correspondientes mediante espectroscopia UV por un periodo de tiempo de 34 minutos con intervalos de lectura de 2 minutos.

6. Metodología de Estandarización

El método se estandarizó de acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS en la Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) (Chaloner-Larsson et al. 1997) y por la AEOI (Ortega et al. 2001) (), en términos de linealidad, precisión y exactitud, especificidad y robustez (**Ver Tabla 3- Tabla Resumen de Parámetros de Estandarización**).

6.1 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 estándar. Para este método se realizaron 5 curvas de calibración de Tx con cada una de las concentraciones mencionadas anteriormente (Tx a 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M y 6.25 μ M) y su capacidad de evitar la degradación de la fluoresceína. Mediante la generación de cada una de estas, se calculó el área bajo la curva (ABC) de cada una de las reacciones y se normalizó cada una de estas áreas con el mínimo valor del área del blanco FL + AAPH + Buffer y el máximo valor del área en cuestión (21,23).

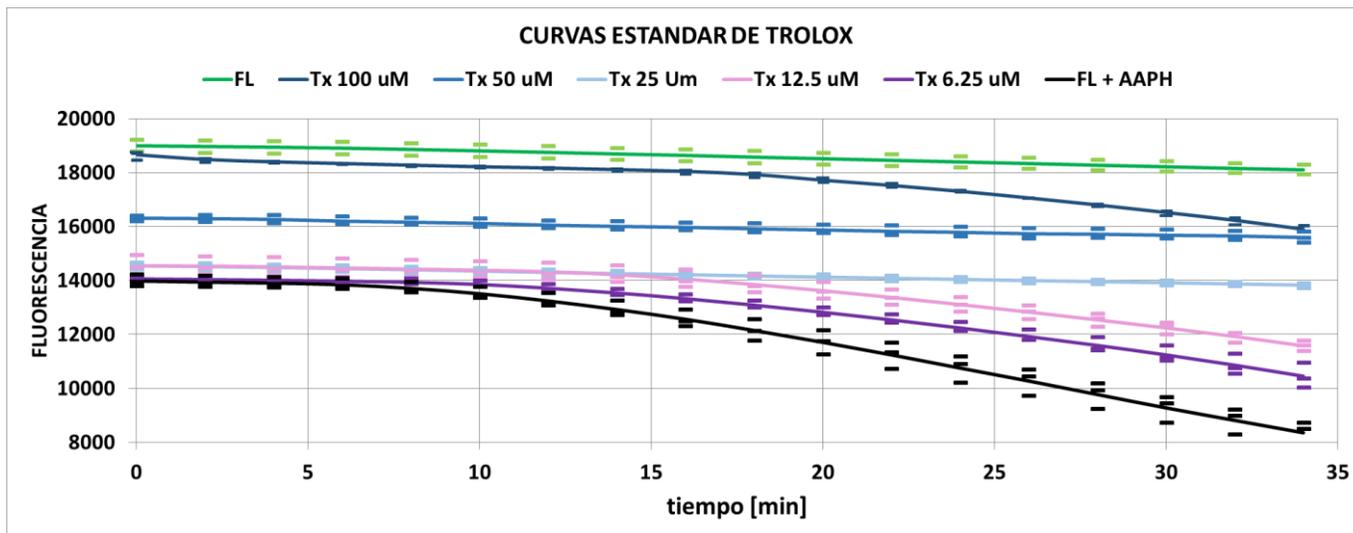


Figura 3. Cinética de oxidación de la FL por acción del AAPH, y la acción del Tx a diferentes concentraciones

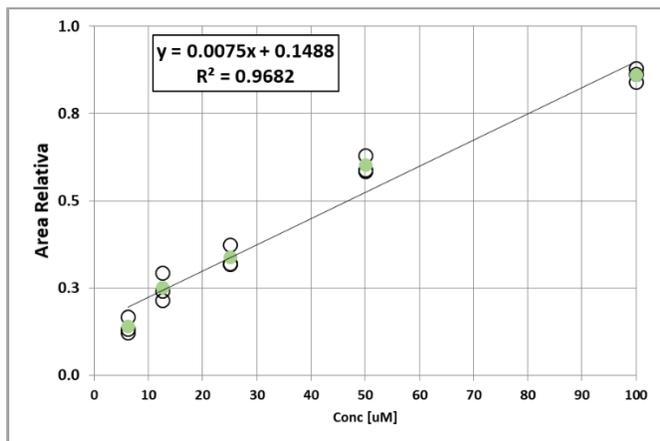


Figura 4. Linealidad de ABC_R y concentración de Tx.

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

fundamentos el coeficiente de correlación. Se realizarán más ensayos para determinar una linealidad óptima y pueda cumplirse este requerimiento.

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

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

6.2 Precisión y Exactitud: Para determinar la precisión y la exactitud del método ORAC se preparan tres ensayos, con concentraciones conocida de 12,5 μ M, 50 μ M y 100 μ M y se calcula el área bajo la curva de la gráfica generada en cada uno de los ensayos y se determina 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). Si la desviación estándar es menor a un 20% se indica que las curvas de calibración poseen una buena precisión y dependiendo de los porcentajes de recuperación se determina a exactitud (20).

Tabla 2. Resultados Prueba de Exactitud.

Conce. [μM]	12,5	50	100
Ensayo 1			
\bar{x}	16493.0	16867.7	17008.6
S^2	1819.8	1112.1	559.6
%DER	11.04	6.37	3.09
%REC	91.8	96.8	100.8
Ensayo 2			
\bar{x}	17396.6	17866.5	18117.0
S^2	2562.2	957.9	132.2
%DER	14.58	4.80	0.66
%REC	86.2	111.1	97.6
Ensayo 3			
\bar{x}	18128.2	17861.6	17741.7
S^2	2479.6	1322.4	793.1
%DER	16.03	7.89	4.6
%REC	86.7	94.1	96.0

Mediante los datos obtenidos con las pruebas de Precisión y Exactitud 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 es la fluoresceína (Conservación de la Fluorescencia).

6.3 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 (21), por el contrario el L-ácido ascórbico es un 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 50 μ M y 100 μ M, se generaron las gráficas de las cinéticas de oxidación de FL (Ver 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 (21, 22).

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, presentándose resultados negativos para dicha actividad.

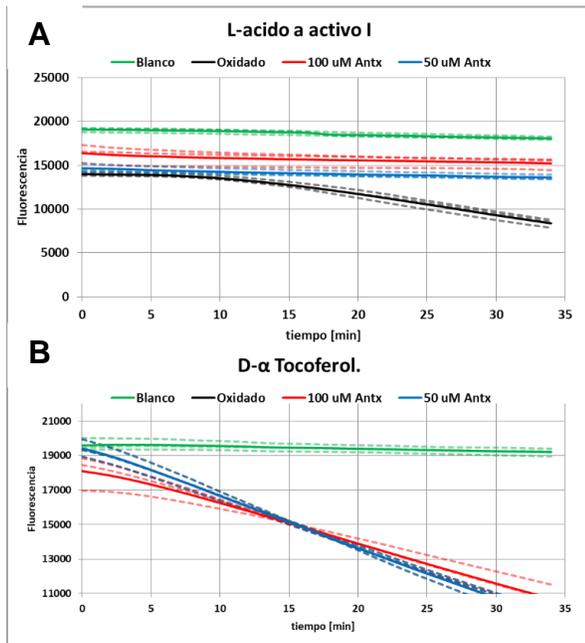


Figura 5. Cinéticas de oxidación de fluoresceína con L-ácido ascórbico y D α Tocoferol. A) Cinética del L-ácido ascórbico B) Cinética del D α Tocoferol

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 ejerce 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 80.21% de la capacidad antioxidante del Trolox

6.3.1 Capacidad Antioxidante de muestras de bebidas fermentadas. Con los parámetros anteriormente descritos se evaluó la capacidad antioxidante de cuatro muestras de bebidas fermentadas

elaborados mediante la mezcla de diversos tipos de frutas, elaborados por los estudiantes del curso de Fundamentos de Biotecnología 2018-02 de la Universidad CES en 2 concentraciones conocidas de $0.1 \mu\text{M}$ y $0.01 \mu\text{M}$ y se determinó la cinética oxidación de la FL en presencia de estas muestras (Ver figura 6)

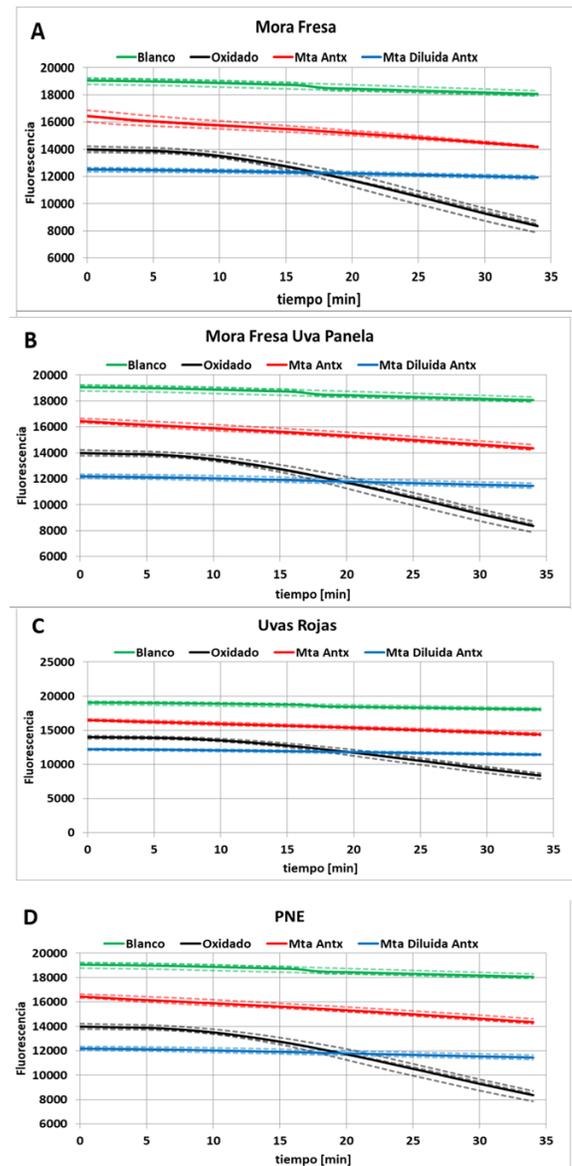


Figura 6. Cinéticas de Oxidación Muestras de Bebidas Fermentadas A) Cinética de Oxidación de FL por acción del AAPH en

presencia de muestra de bebida fermentada de Mora/Fresa. **B)** Cinética de Oxidación de FL por acción del AAPH en presencia de muestra de Mora/Fresa/Uva/Panela. **C)** Cinética de Oxidación de FL por acción del AAPH en presencia de muestra fermentada de Uvas Rojas. **D)** Cinética de Oxidación de FL por acción del AAPH en presencia de muestra fermentada de Uvas Rojas sin Piel.

Se calculo la capacidad antioxidante de las cuatro bebidas fermentadas que se realizaron y se determinó que la bebida de frutos Mora-Fresa presenta una equivalencia a Trolox de $1,09E+08$ y corresponde a 68.52%. El fermentado de Mora/Fresa/Uva/Panela al ser una mezcla de fermentada de frutas con capacidad antioxidante se encontró que esta tiene una equivalencia a Trolox de $1,16E+08$ lo cual corresponde a un 72.54% de la capacidad antioxidante del Trolox. Para el fermentado de Uvas Rojas este equivale a Trolox a un $6,00E+07$ y esto equivale a un 37.51% y la muestra fermentada elaborada a partir de uvas rojas sin piel, presentó una equivalencia de $5,41E+07$ y corresponde a un 31.86% siendo el que presenta la menor actividad. Con los datos obtenidos puede determinarse que la mezcla de Mora/Fresa/Uva/Panela tiene una capacidad antioxidante mayor a comparación de las otras mezclas como fuente de azúcares para fermentación debido a que puede retardar con una mayor capacidad la oxidación de FL en el tiempo.

6.4 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 determinó la capacidad antioxidante del Trolox en 20 días diferentes. (Ver figura 7) Los ensayos se evaluaron con soluciones de Tx en sus diversas concentraciones (24).

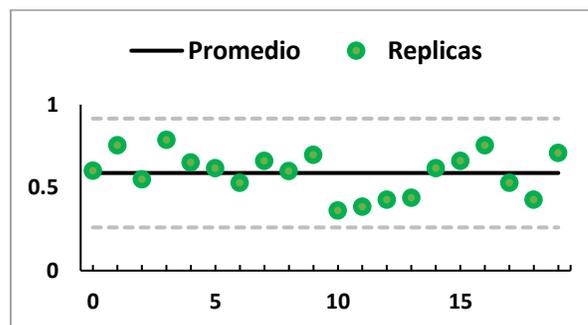


Figura 7. Robustez del ensayo ORAC para el Trolox. En líneas continuas se muestra el valor promedio y el margen de $\pm 10\%$ en exactitud.

Tabla 3. Tabla Resumen de Parámetros de Estandarización.

Parámetro	Procesamiento Estadístico	Resultados			Criterios de Aceptación
LINEALIDAD	Coefficiente 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			
PRECISIÓN		Conc. Baja	Conc. Media	Conc. Alta	
Repetibilidad y Reproducibilidad	%CV _{repet}	3.27	2.70	2.97	%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 Trolox.			
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	

Conclusiones

Se estandarizo 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.

Se determinó la capacidad antioxidante de muestras de bebidas fermentada, elaboradas a partir de diversas mezclas de frutas. Se cuantifico sus propiedades antioxidantes mediante las unidades ORAC a concentraciones de 0.1 μM y 0.01 μM. Comparativamente con el Trolox, este valor

para cada una de las muestras corresponde a 72.54%, 68.52%, 37.51% y 31.86% de su propiedad antioxidante respectivamente, siendo la mezcla Mora/Fresa/Uva/Panela la que presenta una mayor actividad, por lo cual se determina que la mezcla de material vegetal con alto grado de concentración polifenólica aumenta la actividad antioxidante en un alimento.

El uso de metodologías que evalúan la capacidad de barrido de radicales libres deben ser realizadas de forma meticulosa 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

- Universidad CES
- Diego Fernando Rojas Vahos - Jefe de Programa Química Farmacéutica
- Erika Juliana Obando Montoya - Docente Universidad CES Facultad de Ciencias y Biotecnología
- Julie Fernanda Benavides Arévalo - Docente Universidad CES Facultad de Ciencias y Biotecnología
- Edward Mauricio Echeverri Pineda - Docente Universidad CES Facultad de Ciencias y Biotecnología
- Diana María Carmona - Química Auxiliar Laboratorio Universidad CES
- Sergio Álzate - Químico Auxiliar de Laboratorio Universidad CES

Referencias

1. Antioxidantes [Internet]. [citado 24 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/antioxidants.html>
2. 7.3 ¿Qué son los radicales libres? — OCW Universidad de Cantabria [Internet]. [citado 11 de abril de 2017]. Disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-7.-dano-oxidativo-y-envejecimiento/7.3-bfque-son-los-radicales-libres>
3. García Z, E A, Eirez Izquierdo M, Izquierdo Expósito M. Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cuba Investig Bioméd.* marzo de 2004;23(1):51-7.
4. Sheikh S, Safia, Haque E, Mir SS. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *J Neurodegener Dis.* 30 de diciembre de 2012;2013:e563481.
5. Llesuy S, Evelson P, Campos AM, Lissi E. Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review. *Biol Res.* 2001;34(2):51-73.
6. Díaz-Hung ML, González Fragueta ME. El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas: ¿causa o consecuencia? *Neurología.* 1 de octubre de 2014;29(8):451-2
7. Dorta E, Aspée A, Pino E, González L, Lissi E, López-Alarcón C. Controversial alkoxy and peroxy radical scavenging activity of the tryptophan metabolite 3-hydroxy-anthranilic acid. *Biomed Pharmacother.* junio de 2017;90:332-8.

8. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Patología humana. Elsevier España; 2003. 800 p.
9. Fagali NS. Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes [Internet] [Tesis]. Facultad de Ciencias Exactas; 2011 [citado 11 de abril de 2017]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/2739>
10. Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic content of fruits and vegetables from Colombia. *Perspect En Nutr Humana*. junio de 2014;16(1):25-36.
11. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Sci Technol Camp*. diciembre de 2005;25(4):726-32.
12. Rojano BA, Gaviria CA, Sáez JA. ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION IN A LIPIDIC PEROXIDATION MODEL OF BUTTER INHIBITED BY ISOESPINTANOL. *Vitae*. julio de 2008;15(2):212-8.
13. Chacón V, Alejandra M. Validación de un método para valorar potencial antioxidante (orac - oxigen radical absorbance capacity). 1 de julio de 2015 [citado 24 de mayo de 2017]; Disponible en: /biblioteca_digital/handle/10906/78784
14. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J Agric Food Chem*. 1 de mayo de 2003;51(11):3273-9.
15. Rojano BA, Zapata Acosta K, Correa C, B F. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Rev Cuba Plantas Med*. diciembre de 2012;17(4):408-19.
16. Pacifico S, Gallicchio M, Lorenz P, Potenza N, Galasso S, Marciano S, et al. Apolar *Laurus nobilis* leaf extracts induce cytotoxicity and apoptosis towards three nervous system cell lines. *Food Chem Toxicol*. 1 de diciembre de 2013;62(Supplement C):628-37.
17. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants (PDF Download Available) [Internet]. ResearchGate. [citado 17 de septiembre de 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/269713617_Advantages_and_limitations_of_common_testing_methods_for_antioxidants
18. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays (PDF Download Available) [Internet]. ResearchGate. [citado 17 de septiembre de 2017]. Disponible
19. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A, Fonseca Costa Filho MA da, Gomez Herrera JF, Unit WHOVS and Q. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). 1998 [citado 31 de Mayo de 2017]; Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/64975>
20. Vitamina E__alfa_tocoferol_acetato_.pdf [Internet]. [citado 31 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4091->

62934192e7320ed61a0e79fcd0b95f056885
aa39/main/files/Vitamina_E__alfa_tocofero
L_acetato_.pdf

21. Zuluaga CM, Díaz AC, Quicazán MC. Estandarización y validación del método de análisis del perfil aromático por nariz electrónica [Internet]. Ingeniería e Investigación. 2011 [citado 19 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=64322334008>

22. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010): USDA ARS [Internet]. [citado 31 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-of-selected-foods-release-2-2010/>

23. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J Agric Food Chem. 11 de marzo de 2009;57(5):1768-74.