



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA**  
**DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN**  
**MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Autor: MARÍA DEL CARMEN REGUILLO MUÑOZ

Tutora: MARÍA ANTONIA MARTÍN CARMONA

Convocatoria: FEBRERO 2018

## RESUMEN:

**Introducción y antecedentes:** Los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian, de oxígeno y de nitrógeno, se forman en múltiples reacciones químicas que se dan en las células de nuestro organismo. Son esenciales para la vida, ya que están involucradas en varias funciones biológicas, pero este proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante, con el fin de mantener el equilibrio homeostático. Si este equilibrio homeostático se altera por exceso de radicales libres y especies reactivas, se produce un estrés "oxidativo" o "nitrosativo" que contribuye a procesos patológicos relacionados con diferentes enfermedades cancerosas, neurodegenerativas, virales, tóxicas o inflamatorias.

**Objetivos:** Presentar una revisión actualizada de los conceptos fundamentales de los antioxidantes y los radicales y libres y conocer los métodos para determinar tanto la capacidad antioxidante específica en muestras biológicas según sean enzimáticas o no enzimáticas, como la total, en función de si transfieren un hidrógeno o un electrón.

**Metodología:** se realizó una revisión bibliográfica en las fuentes de datos que recogen información como PUBMED, Google Académico, Science Direct.

**Resultados y discusión:** Los métodos analíticos para medir la capacidad antioxidante específica más utilizados pueden ser: enzimáticos (SOD, CAT, GPx, GR, GST) o no enzimáticos (Vitaminas E y C, Glutathion).

Para medir la capacidad antioxidante total se utilizan métodos analíticos en función de la transferencia de átomos de hidrógeno (ORAC, TRAP), transferencia de electrones (FRAP) o mixto (ABTS).

**Conclusiones:** Se han recogido algunos de los métodos analíticos más utilizados actualmente para medir la capacidad antioxidante en muestras biológicas, aunque al ser un área en auge se siguen estudiando y perfeccionando métodos analíticos cada vez más selectivos y complejos, con el fin de seguir avanzando en el estudio de la posible relación de enfermedades relacionadas con el exceso de estrés oxidativo y nitrosativo, y la probabilidad de hacer frente con la terapia antioxidante.

**Palabras clave:** Antioxidantes, radicales libres, capacidad antioxidante, métodos analíticos, muestras biológicas.

INDICE:

PÁGINAS:

1) INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	4
1.1) Radicales libres .....	4
1.2) Antioxidantes.....	5
2) OBJETIVOS .....	7
3) METODOLOGÍA .....	7
4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	8
4.1) Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante ESPECÍFICA en muestras biológicas .....	8
a) Enzimáticas .....	9
b) No enzimática .....	11
4.2) Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante TOTAL en muestras biológicas .....	12
4.2.1) Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH).14	
4.2.2) Métodos basados en la transferencia de electrones (TE) .....	16
4.2.3) Métodos MIXTOS basados en TAH y TE .....	17
5) CONCLUSIONES .....	19
6) BIBLIOGRAFIA .....	19

## 1) INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático. Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Entre los antioxidantes que se ingieren por la dieta destacan las vitaminas y los compuestos fenólicos que por diversos mecanismos neutralizan especies radicalarias. Estas especies pueden encontrarse en el plasma sanguíneo, que puede estabilizar especies reactivas del oxígeno, previniendo reacciones que pueden generar especies aún más nocivas. Es de especial importancia su consumo moderado a través de la dieta y evitar los factores de riesgo que inducen reacciones oxidativas en nuestro organismo. (Avello et al, 2006)

### 1.1) Radicales libres:

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. (Avello et al, 2006)

Especies reactivas de oxígeno (ROS) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. Se generan en cada célula durante la oxidación normal. Los ROS más importantes incluyen: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), radical hidroperóxido ( $HOO^{\cdot}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singlete ( $O_2^1$ ). Las especies de oxígeno reactivo pueden reaccionar con estructuras celulares clave y moléculas que alteran su función biológica. De manera similar, las especies de nitrógeno reactivas (RNS) como el óxido nítrico (NO) o el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) tienen actividad fisiológica o reaccionan con diferentes tipos de moléculas para formar productos tóxicos. ROS y RNS son importantes en el proceso de generación de energía, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ADN, nitración, nitrosación o nitrosilación y respuesta a catecolaminas. Las especies reactivas de oxígeno / nitrógeno se neutralizan mediante actividad enzimática o antioxidantes naturales que detienen la formación inicial de radicales. La sobreproducción de ROS o RNS produce un estrés "oxidativo" o "nitrosativo" que contribuye a la variedad de procesos patológicos típicos de diferentes enfermedades cancerosas, neurodegenerativas, virales, tóxicas o inflamatorias. (Rutkowski et al, 2007)

Las especies reactivas de oxígeno producidas endógenamente son esenciales para la vida, ya que están involucradas en varias funciones biológicas. Sin embargo, cuando se sobre producen (p. Ej. Debido a estimulación exógena) o cuando los niveles de antioxidantes se agotan severamente,

estas especies reactivas se vuelven altamente dañinas, causando estrés oxidativo por la oxidación de biomoléculas, lo que lleva a daño celular que puede volverse irreversible y causar muerte celular. (Gomes et al.,2005)

## 1.2) Antioxidantes:

Un antioxidante es cualquier sustancia que, a bajas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable, retarda o previene de forma significativa la oxidación de ese sustrato, actuando como donador de electrones (agente reductor). (Halliwell et al, 1999)

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena. Sin embargo, es necesario distinguir también entre actividad estabilizadora de radicales libres o anti-radicalaria (en inglés, scavenger) y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad anti-radicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante. (Londoño, 2012)

Los antioxidantes se pueden clasificar de varias formas:

### a) Dependiendo de su procedencia:

a.1) Endógenos: enzimas: catalasa, superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoci-metionina-reductasas.

a.2) Exógenos: no enzimáticos; las vitaminas: E y C, los betacarotenos, los flavonoides y los licopenos, fitoestrógenos polifenoles, glutatión, ácido úrico, ubiquinol (Co-enzima Q), melatonina.

Además de las vitaminas, los oligoelementos como el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio y el hierro son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes.

### b) Dependiendo de su mecanismo de acción:

b.1) Antioxidantes primarios o preventivos:

Previene la formación de nuevos radicales libres, convirtiendo los existentes, en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar y aumentar su cantidad. Son los antioxidantes de naturaleza enzimática (SOD, CAT, GSH-Px...)

b.2) Antioxidantes secundarios “chain breaking”:

Capturan los radicales libres evitando así que se produzcan reacciones en cadena.

Ej: vitamina E y C.

b.3) Antioxidantes terciarios:

Reparan biomoléculas dañadas por radicales libres. (Lacalle, 2007)

Los antioxidantes se regeneran y se cargan de hidrógenos y electrones a través del sistema de glutatión-NADPH y de la reducción de NADP+ a partir del metabolismo. De tal forma las enzimas antioxidantes, los co-sustratos antioxidantes y los antioxidantes endógenos y exógenos generan barreras para conducir la reducción de los oxidantes y disminuir así su potencia oxidativa, con lo que se hace frente a la variedad de diversas especies y formas oxidativas capaces de agredir al organismo. Los antioxidantes se pueden medir en función de su capacidad antioxidante específica o global. La mejora tecnológica e interpretativa de estos métodos ha permitido profundizar en el conocimiento básico de las formas de defensa de la célula, ha multiplicado los estudios de capacidad antioxidante desde sustancias puras hasta organismos complejos, sirviendo incluso para métodos diagnósticos y de evaluación de la efectividad de los tratamientos. (Quintanar et al, 2009)

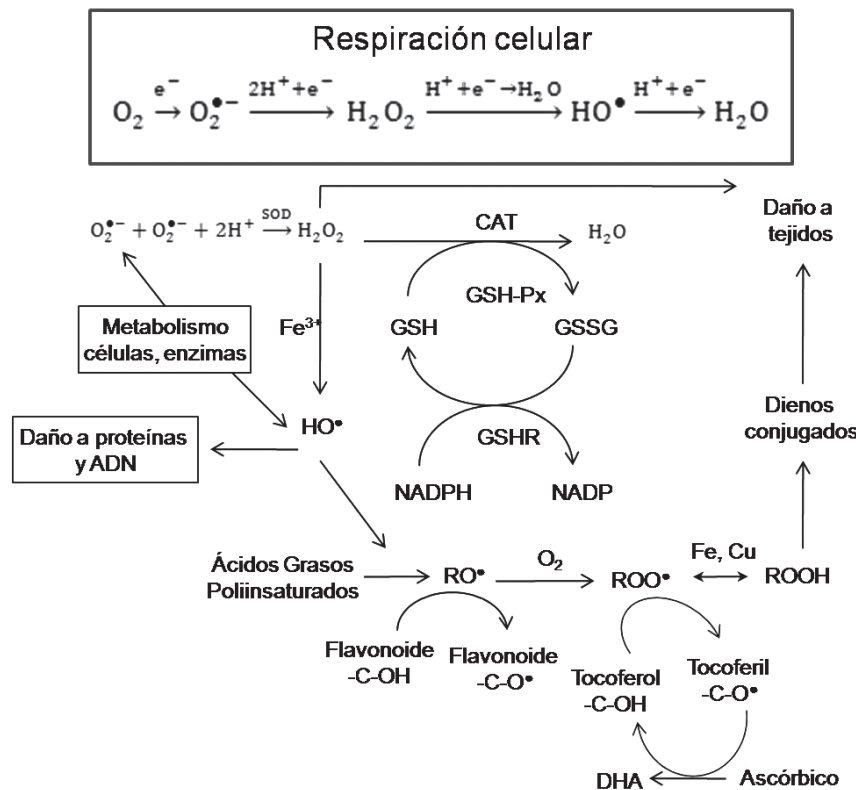


Figura 1. Resumen de las vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos. ( $O_2^{\bullet-}$ ): radical anión superóxido, ( $HO^{\bullet}$ ): radical hidróxilo, ( $RO^{\bullet}$ ): radical alquilo, ( $ROO^{\bullet}$ ): radical peróxido, ( $ROOH$ ): hidroperóxido, ( $Fe$ ): hierro, ( $Cu$ ): cobre, ( $GSH$ ): glutatión reducido, ( $GSSG$ ): glutatión oxidado, ( $GSH-Px$ ): glutatión peroxidasa, ( $GSHR$ ): glutatión reductasa, ( $NADPH$ ): Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, ( $CAT$ ): catalasa, ( $SOD$ ): Superóxido Dismutasa. (Londoño, 2012)

## 2) OBJETIVOS

•El primer objetivo de este trabajo de fin de grado es presentar una revisión actualizada de los conceptos fundamentales de los antioxidantes, abarcando tanto el conocimiento de los radicales libres de importancia biológica, como algunas de las enzimas de defensa antioxidante.

•El segundo objetivo se basa en:

- Conocer los métodos para determinar la capacidad antioxidante específica en muestras biológicas como puede ser la de la vitamina C o la Superóxido Dismutasa, agrupándolas según sean enzimáticas o no enzimáticas.
- Conocer también la capacidad antioxidante total en muestras biológicas, diferenciando estos métodos según su fundamento, en función de si se transfieren hidrógenos o electrones.

## 3) METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica en las fuentes de datos que recogen información como PUBMED, Google Académico, Science Direct.

Se buscó información, tanto en castellano como en inglés, con palabras clave como: antioxidantes, radicales libres, estrés oxidativo, métodos analíticos, ORAC, FRAP, ABTS, TRAP, enzimas antioxidantes, Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutation Peroxidasa, Glutation-S-Tranferasa eritrocitaria, Glutation Reductasa, Vitamina C, Vitamina E, Glutation, muestras biológicas humanas, plasma, sangre, orina, saliva.

Se excluyó aquella información relacionada con alimentos, bebidas, plantas, animales, suelo...para evitar errores de datos relacionados con los métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante.

Cabe destacar que, aunque la revisión bibliográfica en las diversas fuentes de datos ha sido muy extensa, el acceso al contenido de toda la información que obtenemos no siempre está disponible, lo que limita, en cierto modo, la recogida de los datos de forma exacta y detallada.

## 4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se desarrolla el fundamento de algunas de las técnicas más utilizadas para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Se pueden clasificar en función de la capacidad antioxidante que se mida, que podrá ser específica o total.

La valoración de la capacidad antioxidante específica se basa en la reacción de un sustrato oxidable en contacto con un oxidante para obtener un nivel máximo de oxidación en presencia o ausencia de antioxidante. El grado de inhibición de la oxidación define la cantidad de antioxidante que hay en la muestra, que proporciona un cierto grado de protección.

La medida de la capacidad antioxidante total (TAC) considera la acción acumulativa de todos los antioxidantes presentes en el plasma y los líquidos corporales, proporcionando así un parámetro integrado en lugar de la simple suma de antioxidantes que se pueden medir. Por lo tanto, se evalúa la capacidad de los antioxidantes conocidos y desconocidos y su interacción sinérgica, lo que proporciona una idea del delicado equilibrio in vivo entre oxidantes y antioxidantes. La medición de la TAC plasmática puede ayudar en la evaluación de los factores fisiológicos, ambientales y nutricionales del estado redox en humanos. (Ghiselli, et al, 2000).

### **4.1) Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante ESPECÍFICA en muestras biológicas:**

Para evitar el daño oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión. Por ello cuenta con sistemas de defensa antioxidante para poder hacer frente.

Los sistemas de defensa antioxidante son las enzimas, antioxidantes endógenos y co-sustratos de antioxidantes. Se pueden valorar independientemente a través de medir su actividad, expresión y concentración. Es posible evaluar su capacidad antioxidante de forma directa por diferentes métodos, por ejemplo, mediante la concentración de una proteína de transporte, la enzima antioxidante o de reparación, la actividad de una enzima antioxidante, la concentración neta de un antioxidante o de un co-sustrato antioxidante, necesario para la actividad de enzimas antioxidantes.

Las valoraciones de antioxidantes son frecuentemente de forma indirecta y por inhibición, donde un agente oxidante llamado inductor generalmente un radical libre, oxida a una molécula monitor (sonda) que sufre un cambio de color, emite luz (quimioluminiscencia), fluorescencia o electricidad o se puede detectar por sus productos (inmunoquímica o espectro de masas); la



capacidad antioxidante se mide cuando al colocar la muestra a evaluar, la oxidación de la molécula sonda se oxida y con ello el parámetro modificado. Una vez comparada la intensidad de la inhibición de la modificación en las mismas condiciones con un antioxidante de potencia conocida, por ejemplo, trolox, se pueden obtener los equivalentes de la capacidad antioxidante.

Las técnicas analíticas que se utilizan para determinar la capacidad antioxidante específica en muestras biológicas las dividiremos en dos: enzimáticas y no enzimáticas:

a) Enzimáticas:

a.1) Superóxido Dismutasa (SOD)



Figura 2: Reacción de la SOD para la dismutación de  $O_2^{\bullet -}$  en peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular.

La actividad de la SOD se puede estudiar generando el radical ( $O_2^{\bullet -}$ ) (anión superóxido), por el sistema xantina-xantina oxidasa en presencia de oxígeno, el radical induce la oxidación del cromógeno azul de nitrotetrazolio y da origen a un compuesto coloreado. Mediante espectrofotometría se puede detectar, a una longitud de onda de 560 nm, la actividad de SOD presente en la muestra, ya que esta enzima reduce el radical ( $O_2^{\bullet -}$ ), obteniéndose con ello el grado de inhibición de la reacción. La actividad de SOD es proporcional a la disminución de cromógeno por unidad de tiempo. (Quintanar et al, 2009)

a.2) Catalasa (CAT)

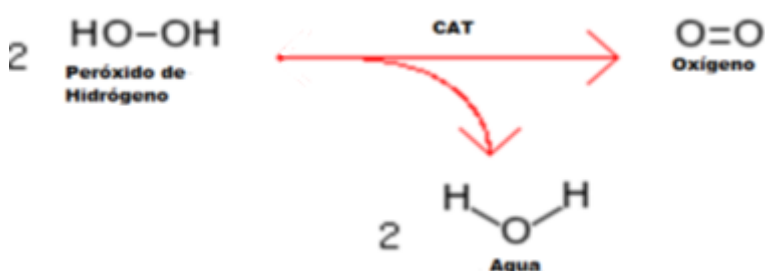


Figura 3: Reacción catalítica de la catalasa, en esta reacción se utilizan dos moléculas de  $H_2O_2$  para su conversión en  $O_2$  y Agua metabólica.

Para evaluar la actividad de la CAT se utiliza el método de Aebi, basado en la reacción de descomposición del  $H_2O_2$ . Se realiza mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 240nm y se detecta la presencia de enzima por la disminución de la absorción medida a esa longitud de onda en la muestra, que se corresponde con la descomposición del  $H_2O_2$ . También se puede medir la liberación de  $O_2$  utilizando un electrodo específico. (Quintanar et al, 2009) (Casado et al, 1998)

### a.3) Glutation Peroxidasa (GPx)

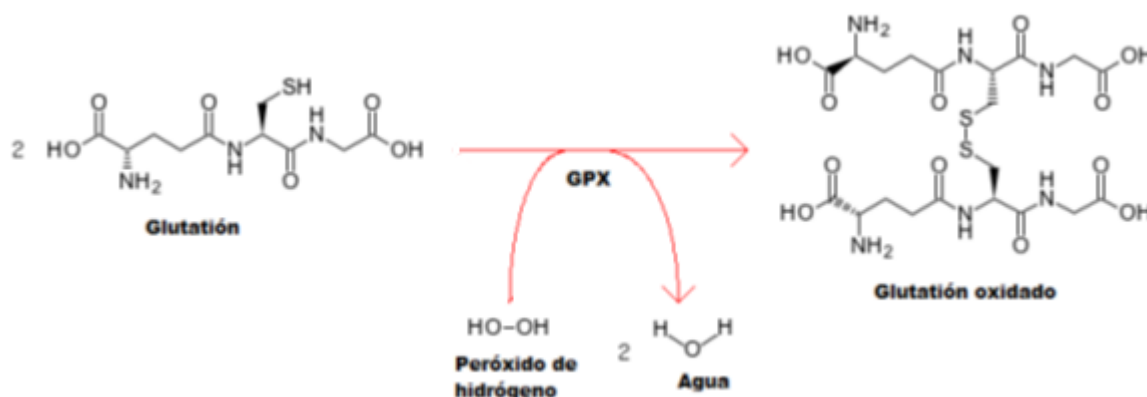
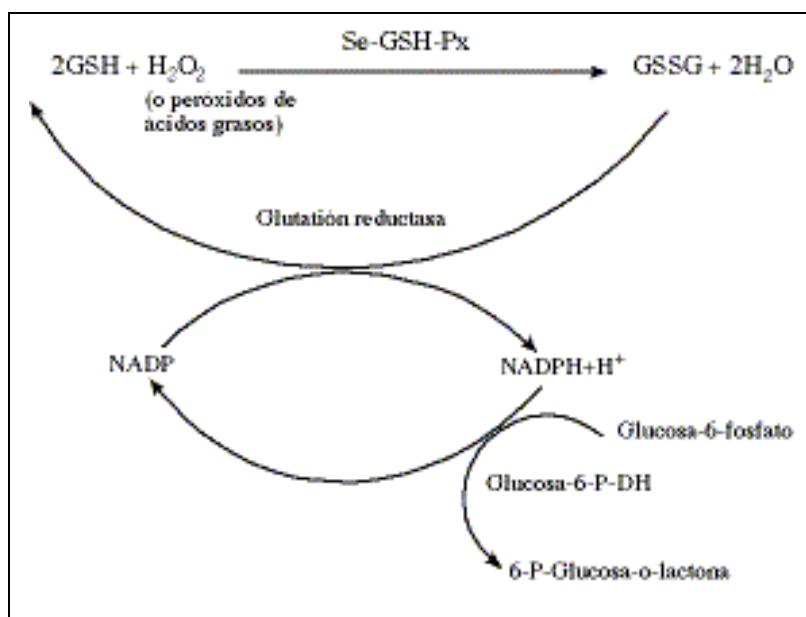


Figura 4: Reacción en la que el glutatión reducido pasa a Glutacion oxidado por la acción de la GPx, liberando 2 moléculas de agua.

La acción de la GPx puede ser valorada indirectamente por la reacción acoplada con la GR. El GSSG producido por la reacción con los hidroperóxidos, catalizada por la GPx, es reciclado a su estado reducido por la GR usando como coenzima el NADPH. La oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> se acompaña de la disminución de su absorbancia a 340 nm, la tasa de disminución de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad GPx de la muestra. (Calderón et al, 2009)

### a.4) Glutation Reductasa (GR)

La GR se puede evaluar por espectrofotometría por la pérdida de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm generada por la oxidación de NADPH o por el incremento en la absorbancia a 412 nm generado por la reducción del ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). (Calderón et al, 2009)



### a.5) Glutati6n-S-Transferasa eritrocitaria (GST)

La actividad de la enzima GST (Glutati6n-S-Transferasa eritrocitaria) puede ser determinada utilizando como sustratos al 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) y glutati6n reducido (GSH), en donde la GST cataliza la conjugaci6n del grupo tiol del glutati6n al CDNB. La absorbancia del producto GS-DNB a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad de la GST. (Calder6n et al, 2009)

b) No enzimáticas:

b.1) Vitamina E:

Vitamina E es el término que se utiliza para tocoferoles y tocotrienoles. Existe gran correlación entre los niveles de vitamina E con el contenido de lípidos y colesterol en plasma, ya que es una vitamina liposoluble.

La concentración de tocoferoles totales en suero es el índice más usado para medir la vitamina E, siendo de mayor precisión la determinación de sus isómeros, a través del método de cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC).

Se detectan los distintos componentes de la vitamina E de la muestra, mediante detectores de fluorescencia a:  $\lambda_{exc}:298nm$ ;  $\lambda_{em}:328nm$ .

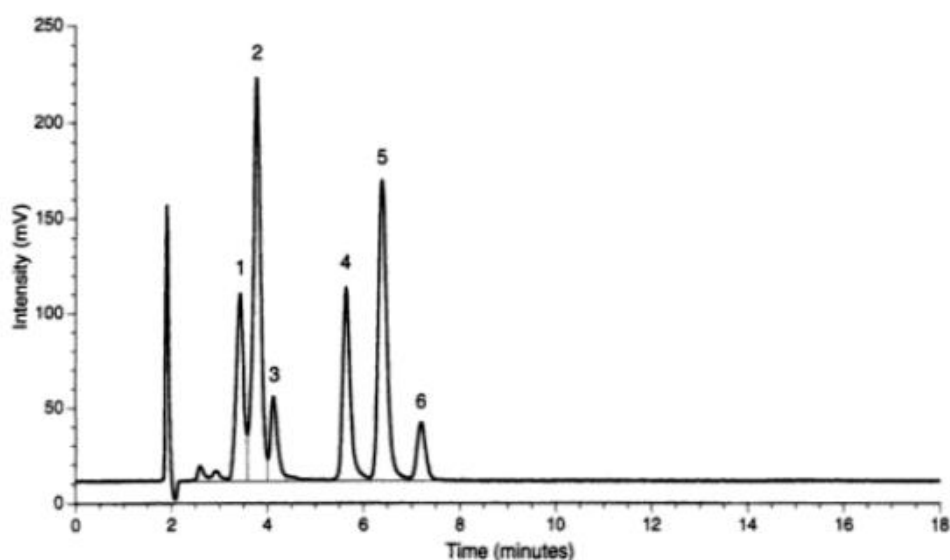


Figura 5: Separación de una mezcla de tocoferoles por HPLC de fase inversa. Condiciones cromatográficas: columna (Ultrasphere ODS,  $5\mu m, 250 \times 4.6 mm$ ); fase móvil, acetonitrilo: tetrahidrofurano: metanol:acetato de amonio al 1%, (684:220:68:28, v/v/v/v); detección mediante fluorescencia:  $\lambda_{exc}:298nm$ ;  $\lambda_{em}:328nm$ . Identificación de los picos: 1)  $\delta$ -tocotrienol, 2)  $\beta, \gamma$ -tocotrienol, 3)  $\alpha$ -tocotrienol, 4)  $\delta$ -tocoferol, 5)  $\beta, \gamma$ -tocoferol, 6)  $\alpha$ -tocoferol. (De Leenheer, 2000)

Además, conjuntamente puede realizarse el test de hemólisis de eritrocitos en la presencia de peróxido de hidrógeno al 2%, el cual proporciona un índice del potencial antioxidante. También se ha sugerido la determinación del metabolito urinario de alfa-tocoferol: 2,5,7,8-tetrametil-2(2-carboxietil)-6-hidroxicromano como un indicador de adecuado consumo de vitamina E. (Márquez et al, 2002) (De Leenheer, 2000)

### b.2) Vitamina C:

Para la cuantificación de los niveles sanguíneos de vitamina C, se utiliza la cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa (RP-HPLC), con columnas poliméricas de octadecilo (C18)

Se utilizan agentes de apareamiento iónico en la fase móvil, que principalmente consiste en el agua y algún disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo. El pH por lo general se mantiene entre 2,4 y 6,5 con el tampón fosfato o de acetato.

Se emplea además un detector de absorción ultravioleta-visible, a una longitud de onda de 254nm para medir los niveles de ácido ascórbico (vitamina C) en la muestra.

Un aspecto peculiar de la vitamina C es su inestabilidad. A pH biológico, su principal forma es el ascorbato, el cual es rápidamente oxidado a dehidroascorbato por lo que disminuye en el fluido biológico extracelular. La oxidación de la vitamina C en el plasma es influenciada por la temperatura, luz, pH, saturación de oxígeno, disolventes y presencia de enzimas oxidantes o de iones de hierro. Por lo tanto, se indica el uso de ditioneitol (DTT), ácido *meta* fosfórico (AMP), cisteína o tris [2-carboxietil] hidrocloretrato fosfina (TCEP) para evitar la oxidación de vitamina C *ex vivo* en muestras de sangre. (Baierle et al, 2012.) (De Leenheer, 2000)

### b.3) Glutathion:

En el caso del glutathion en sus dos formas: oxidado (GSSG) y reducido (GSH) se pueden medir por HPLC por un método "en gradiente" utilizando una columna: NH<sub>2</sub> de Spherisorb (20 x 0.4 cm), la fase móvil será una disolución de acetato sódico anhidro 0,5M en metanol 64%. Para la detección en HPLC: se utiliza el detector UV a 365 nm. A esta longitud de onda obtendremos los picos relacionados con las dos formas de glutathion. (Escrivá, 2015)

## **4.2) Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante TOTAL en muestras biológicas:**

En este apartado veremos los tipos de muestras utilizadas y cómo se dividen las técnicas según su fundamento:

Tipos de muestras utilizadas:

Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante total de las muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador)

en el sistema de ensayo, por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada, que es el iniciador.

- En el plasma, la capacidad plasmática antioxidante total depende preferentemente de la capacidad y cantidad de albúmina y de ácido úrico.

- Cuando se realiza en sangre total, la capacidad sanguínea antioxidante total, evalúa adicionalmente enzimas antioxidantes, glutatión y NADPH.

- La capacidad antioxidante total del eritrocito evalúa los sistemas eritrocitarios y no los plasmáticos.

- En las células se evalúan los mecanismos antioxidantes enzimáticos, glutatión, NADPH y moléculas antioxidantes endógenas y exógenas; pero dependiendo de la célula y los orgánulos predominantes se podrá tener una participación mayoritaria de cierta actividad enzimática o de antioxidantes intracelulares.

- En orina, la capacidad urinaria antioxidante total se evalúa midiendo la distribución y excreción de antioxidantes hidrosolubles endógenos y exógenos y pueden dar un reflejo del consumo o exceso de tales antioxidantes.

- Es posible medir la capacidad antioxidante total en cualquier célula o fluido (líquido cefalorraquídeo, articular, saliva, etc.) y cada vez hay más datos comparativos para entender sus significados y los elementos que reflejan estos resultados. (Quintanar et al, 2009)

Los antioxidantes pueden estabilizar radicales libres siguiendo dos mecanismos, uno llamado Transferencia de Átomos de Hidrogeno (TAH) y otro denominado Transferencia de Electrones (TE), los cuales pueden ocurrir de forma paralela; ambos dan como resultado la estabilización del radical libre; sin embargo, el mecanismo que domina un sistema será determinado por la estructura química del antioxidante, su solubilidad, coeficiente de partición, Energía de Disociación de Enlace (EDE), Potencial de Ionización (PI) y condiciones del medio de reacción, como el pH. (Londoño, 2012)

La selección de la técnica a usar debe de tener en cuenta que los iniciadores pueden ser oxidantes que capturan electrones o hidrógenos, lo cual está valorando al antioxidante que existe en la muestra y con ello puede afectar y ser más o menos eficiente. (Calderón et al, 2009)

#### 4.2.1) Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)

Los métodos TAH miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. Como se muestra en la reacción 1, un sustrato oxidable (LH) es atacado por un radical libre ( $X\cdot$ ) generando una especie no radicalaria (XH) y un nuevo radical libre ( $L\cdot$ ). Por su parte, en la reacción 2 se muestra cómo el antioxidante (AH) transfiere un átomo de hidrógeno para estabilizar el radical libre  $X\cdot$  y generar la especie  $A\cdot$ .

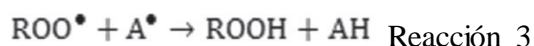
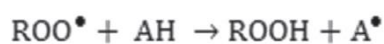
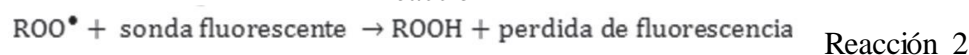
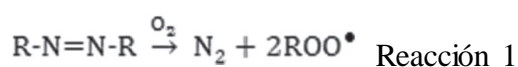
Dentro de este tipo de métodos podemos encontrar:



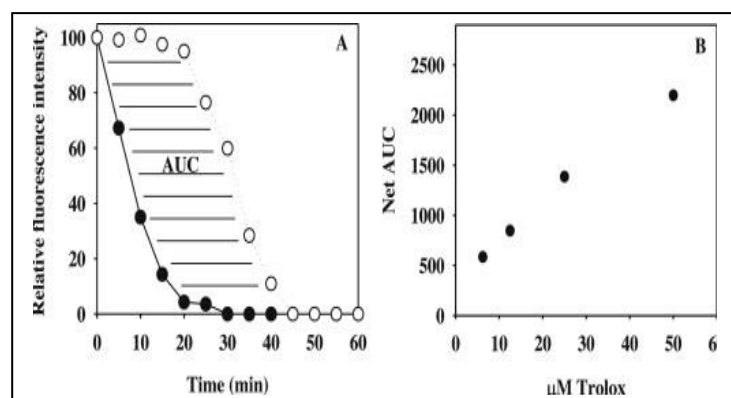
#### ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Este método refleja un mecanismo clásico de actividad mediada por antioxidantes terminadores de cadena mediante TAH. y mide la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo.

Como se muestra en la reacción 1, el radical peroxilo es generado de una fuente como AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), el cual sufre una descomposición térmica para producir nitrógeno molecular y radicales alquilo, que en presencia de oxígeno generarán radicales peroxilo, los cuales reaccionan con una sonda coloreada o fluorescente para formar un producto incoloro o no fluorescente, como se muestra en la reacción 2. La capacidad antioxidante es determinada por la disminución en la velocidad de degradación de la sonda debido a la reacción de los radicales peroxilo con el antioxidante para generar un producto no radicalario, como se muestra en la reacción 3.



En ORAC, generalmente se utiliza fluoresceína como sonda y la reacción suele tener lugar en períodos de tiempo prolongados (>30 minutos) para garantizar la estabilización de la reacción.



Los cálculos para expresar los resultados se obtienen de la integración del Área Bajo la Curva (AUC) de desactivación de fluorescencia calculando el valor de  $AUC_{neta} = AUC_{con\ antioxidant} - AUC_{sin\ antioxidant}$ . Se obtiene así información con respecto a parámetros cinéticos como tiempo de inducción y velocidad inicial en un solo parámetro. Generalmente, el resultado se expresa en términos de equivalencia de Trolox (análogo de vitamina E), para lo cual se construye una curva con diferente concentración y las respectivas AUC de Trolox, que genera una curva de calibración que permite interpolar el AUC de la muestra y expresar su capacidad antioxidante en términos de cantidad equivalente a Trolox. (Londoño, 2012)

#### TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter)

Este ensayo mide la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo y refleja un mecanismo clásico de actividad mediada por antioxidantes terminadores de cadena mediante TAH.

Se emplean radicales peroxilo que se generan mediante la descomposición térmica de un compuesto hidrosoluble: ABAP (2,2'-azo bisClorhidrato de (2-amidinopropano)). Una vez adicionado a la muestra de estudio (plasma originariamente), la oxidación de las moléculas es monitorizada, mediante la determinación de oxígeno consumido.

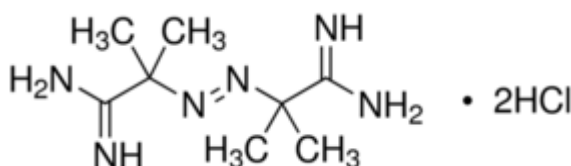


Figura 6: ABAP (2,2'-azo bisClorhidrato de (2-amidinopropano))

El periodo de inducción, en el que la oxidación se inhibe mediante la acción de los compuestos antioxidantes en la muestra, se compara con el generado por el Trolox en iguales condiciones. (Wayner et al. 1985)

Este método se ha propuesto recientemente como una herramienta para explorar el poder antioxidante en muestras de suero. TRAP se puede medir directamente mediante el método HPLC (TRAPm) o calcularse (TRAPc) mediante una fórmula matemática teniendo en cuenta los niveles séricos de cuatro antioxidantes naturales: grupos SH (SH), ácido úrico (U), Vit. E (E) y Vit. C (C). La diferencia entre los dos valores se debe a los antioxidantes que no se pueden medir directamente. (Ceriello et al, 1997)

#### 4.2.2) Métodos basados en la transferencia de electrones (TE):

Estos métodos determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. Describen reacciones más lentas que las TAH y por ello los cálculos de actividad antioxidante se basan en porcentajes de disminución en los productos. En estos métodos, la reactividad relativa de un antioxidante se basa en la desprotonación y está dirigida por el Potencial de Ionización (PI), de tal manera que los valores de PI disminuyen con el aumento del pH, reflejando el incremento en la capacidad electrodonadora con la desprotonación.

Los métodos TE son bastante sensibles a ácido ascórbico y ácido úrico, dos sustancias reconocidas por mantener el estado redox en plasma. Como en los métodos TAH, los metales pueden generar interferencia causando variabilidad en los resultados. (Londoño, 2012)

#### FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El método FRAP se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso; de esta forma, el ion forma un complejo coloreado con el compuesto 2,4,6-Tripiridil-s-Triazine (TPTZ). FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones. Los valores de FRAP se obtienen comparando el cambio de absorbancia a 593 nm en mezclas de reacción de prueba con aquellas que contienen iones ferrosos en concentración conocida. Los cambios de absorbancia son lineales en un amplio rango de concentración con mezclas de antioxidantes, incluido el plasma, y con soluciones que contienen un antioxidante en forma purificada. (Benzie et al,1996)

Se ha argumentado que la capacidad para reducir el hierro se correlaciona poco con la estabilización de radicales libres; sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena y por lo tanto el poder reductor reflejaría la capacidad de un compuesto para regular el estado redox del plasma o tejidos. (Londoño, 2012)

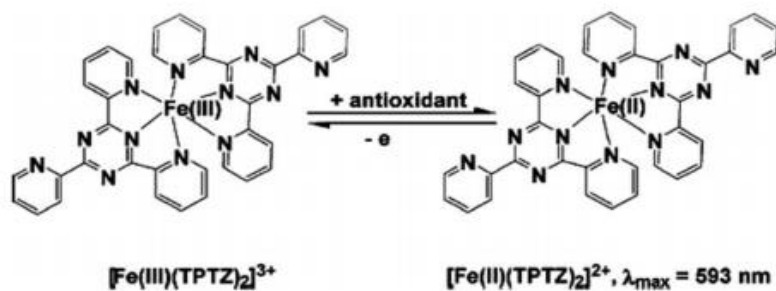


Figura 7: Fundamento del método FRAP, mostrando la reducción de 2,4,6-Tripiridil-Triazina Férrica (TPTZ).



### 4.2.3) Métodos MIXTOS basados en TAH y TE:

#### ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico)

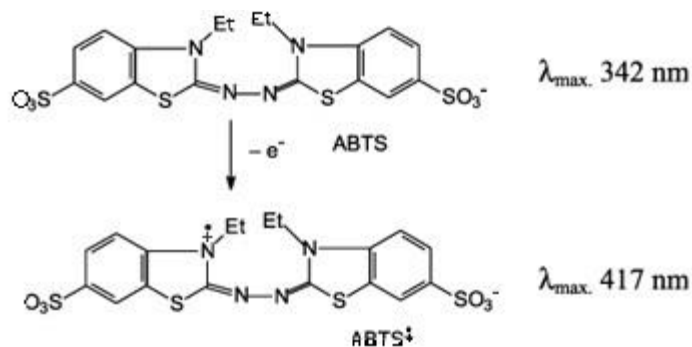
En este método los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS, un cromógeno que presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, y se determina la inhibición en la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde azulada.

Los antioxidantes se añaden una vez formado el radical ABTS, y se determina la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical (decoloración). Este proceso evita interferencias debidas a compuestos intermedios y evita una errónea estimación. (Miller et al, 1993)

Este método se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el catión coloreado  $ABTS^{\bullet+}$ , el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- acido sulfónico)) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC.

Alguna de las ventajas de este método es puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el  $ABTS^{\bullet+}$  es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos.

Una de las desventajas es que el  $ABTS^{\bullet+}$  debe ser generado previamente, ya que no es un radical fisiológico, por lo que es mejor el radical generado químicamente (persulfato potásico), que fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente al método anteriormente descrito. Otra de las desventajas es que la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de manera arbitraria. (Londoño, 2012)



A continuación, se muestran unas tablas a modo de esquema de la información recogida, incluyendo los métodos ampliados en este trabajo y mencionando algunos otros también utilizados.

### Métodos de transferencia de átomos de Hidrógeno

Método analítico	Especie iniciadora	Medida	Técnica	Cuantificación	Expresión de resultados	Tipos de muestras
<b>ORAC</b>	AAPH /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Cu <sup>2+</sup> / CuSO <sub>4</sub>	Inhibición de la caída de fluorescencia de PE/FL	Fluorimetría	Fl a $\lambda$ 540 y $\lambda$ em565nm técnica AUC	Equivalentes de Trolox	Fenoles, alimentos, bebidas, muestras biológicas.
<b>TRAP</b>	AAPH (radicales peroxilo)	Oxígeno consumido	Electrodo de oxígeno	Longitud de fase de retraso	Equivalentes de Trolox	Alimentos, muestras biológicas
<b>DCFH-DA</b>	AAPH (radicales peroxilo)	Inhibición de oxidación de DCFH-DA	Espectrofotometría/ Fluorimetría	Abs: $\lambda$ :504nm/ Fl: $\lambda$ ex 504, $\lambda$ em 529nm- Fase de retraso	Equivalentes de Trolox	Muestras biológicas
<b>Ensayo Crocina</b>	ABAP (radicales peroxilo)	Inhibición de oxidación de Crocina	Espectrofotometría	Abs: $\lambda$ :443nm/ competición cinética	Equivalentes de Trolox	Muestras biológicas

### Métodos de transferencia de electrones (FRAP) y mixto (ABTS)

Método analítico	Especie iniciadora	Medida	Técnica	Cuantificación	Expresión de resultados	Tipos de muestras
<b>FRAP</b>		Reducción TPTZ-Fe <sup>3+</sup> a TPTZ-Fe <sup>2+</sup>	Espectrofotometría	Abs: $\lambda$ :593nm y calibrado FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	$\mu$ mol Fe <sup>2+</sup> / L	Alimentos, bebidas, muestras biológicas
<b>ABTS</b>	Ferrilmioglobina/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> →ABTS <sup>•+</sup>	Descenso de ABTS <sup>•+</sup>	Espectrofotometría	Abs: ABTS: $\lambda$ :342nm ABTS <sup>•+</sup> : $\lambda$ :417nm	Equivalentes de Trolox	Fenoles, bebidas, alimentos, muestras biológicas

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

## 5) CONCLUSIONES

Las enfermedades asociadas directa o indirectamente con daño y estrés oxidativo se han ido incrementado en la sociedad en los últimos años debido a la mala alimentación, la contaminación, el uso excesivo de fármacos, estrés, etc.

. Sin embargo, para que se relacione la participación del estrés oxidativo con una enfermedad es necesario que se cumplan simultáneamente varios criterios como: daños compatibles con oxidación; identificación del agente oxidante en el sitio de lesión; reproducción del daño con otro agente oxidante; que el daño remita al retirar el agente oxidante y que la enfermedad responda al tratamiento antioxidante. Pero la mayor parte de las veces se asocia la enfermedad con la oxidación únicamente por uno de los criterios anteriores, sin importar si se cumple o no con el resto. Lo que sí se ha comprobado es que hay una relación entre los procesos oxidativos y la etiología, patogenia y ciertas complicaciones de algunas enfermedades.

Muchos esfuerzos se han realizado para que las enfermedades asociadas con estrés oxidativo puedan ser diagnosticadas y tratadas con antioxidantes. Se han elaborado una serie de pruebas parciales que muestran resultados favorables con el tratamiento antioxidante, pero que no permiten establecer bases sólidas para la adecuada evaluación de la participación oxidante y antioxidante en el curso de las enfermedades. (Quintanar et al, 2009)

Actualmente se sigue avanzando en el estudio de nuevos métodos analíticos para que, en un futuro, las terapias antioxidantes contribuyan a la mejora de las enfermedades cuyos antecedentes estén relacionados con procesos oxidativos.

## 6) BIBLIOGRAFÍA

- Avello, M. Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172.
- Baierle, M., Bairros, A. V. D., Moreira, A. P. L., Bulcão, R. P., Roehrs, M., Freitas, F. D., & Garcia, S. C. (2012). Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. *Química nova. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 2, (2012), p. 403-407.*
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine*, 14(3), 303-311.
- Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educacion química*, 17(2), 164-173.

- Casado, A., De La Torre, R., López-Fernández, E., & Carrascosa, D. (1998). Niveles de superóxido dismutasa y catalasa en. *Gac Méd Mex*, 134(5).
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Falsetti, E., Taboga, C., Tonutti, L., Crescentini, A., & Bartoli, E. (1997) Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care*, 20(2), 194-197.
- De Leenheer, A. P., & Lambert, W. (Eds.). (2000). *Modern Chromatographic Analysis Of Vitamins: Revised And Expanded*(Vol. 84). CRC Press.
- Escrivá López, C. (2015). Estudio de los valores de referencia para los parámetros de estrés oxidativo: malondialdehído y glutatión, medidos por cromatografía líquida de alta eficacia, en humanos y animales de experimentación. Tesis. Universidad de Valencia.
- Fraga, C. G., Oteiza, P. I., & Galleano, M. (2014). In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 931-934.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106-1114.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 65(2), 45-80.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Lacalle, A. (2007). Antioxidantes En Alimentación: Diferentes Formas De Expresar Su Actividad Antioxidante. Tipos De Unidades Y Métodos De Análisis. *Neiker Tecnalia, Barcelona, España*, 24.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Márquez, M., Yépez, C., Naranjo, R. S., & Rincón, M. (2002). Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Investigación clínica*, 43(3).
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84(4), 407-412.
- Miquel, J., & Ramírez-Boscá, A. (2004). Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria.
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325-340.
- Rutkowski, R., Panciewicz, S. A., Rutkowski, K., & Rutkowska, J. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 23(134), 131-136.
- Valdivieso Izquierdo, L. R. (2015). Estrés oxidativo y marcadores bioquímicos en ratas diabéticas con dieta suplementada con vitamina E.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: the important contribution made by plasma proteins. *FEBS letters*, 187(1), 33-37.