



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

Autora: MARÍA DEL CARMEN REGUILLO MUÑOZ

D.N.I.: 06285982-J

1) INTRODUCCIÓN

Los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian, de oxígeno y de nitrógeno, se forman en múltiples reacciones químicas en 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.

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 (agente reductor).

2) OBJETIVOS

- Revisión actualizada de los conceptos fundamentales de los antioxidantes.
- Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante:
 - Específica (Enzimáticos y no enzimáticos).
 - Total (en función de si se transfieren hidrógenos o electrones).

3) METODOLOGÍA

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

4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación de los métodos analíticos:

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

- a) Enzimáticas: Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutacion Peroxidasa, Glutacion-S-Transferasa, Glutacion Reductasa.
- b) No enzimáticas: Vitamina E, Vitamina C, Glutacion.

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

- 4.2.1) Métodos basados en la transferencia de hidrógeno (TAH): ORAC, TRAP
- 4.2.2) Métodos basados en la transferencia de electrones (TE): FRAP
- 4.2.3) Métodos mixtos basados en TAH y TE: ABTS

NUTRICIÓN:
Son componentes de numerosos alimentos.

BIOQUÍMICA:
Participan en numerosas reacciones enzimáticas.

BOTÁNICA:
Están presentes en gran variedad de plantas y vegetales

ANTIOXIDANTES

FISIOLOGÍA:
Contribuyen al equilibrio homeostático en las células del organismo haciendo frente al estrés oxidativo.

QUÍMICA:
Participan en numerosas reacciones de oxidación y reducción.

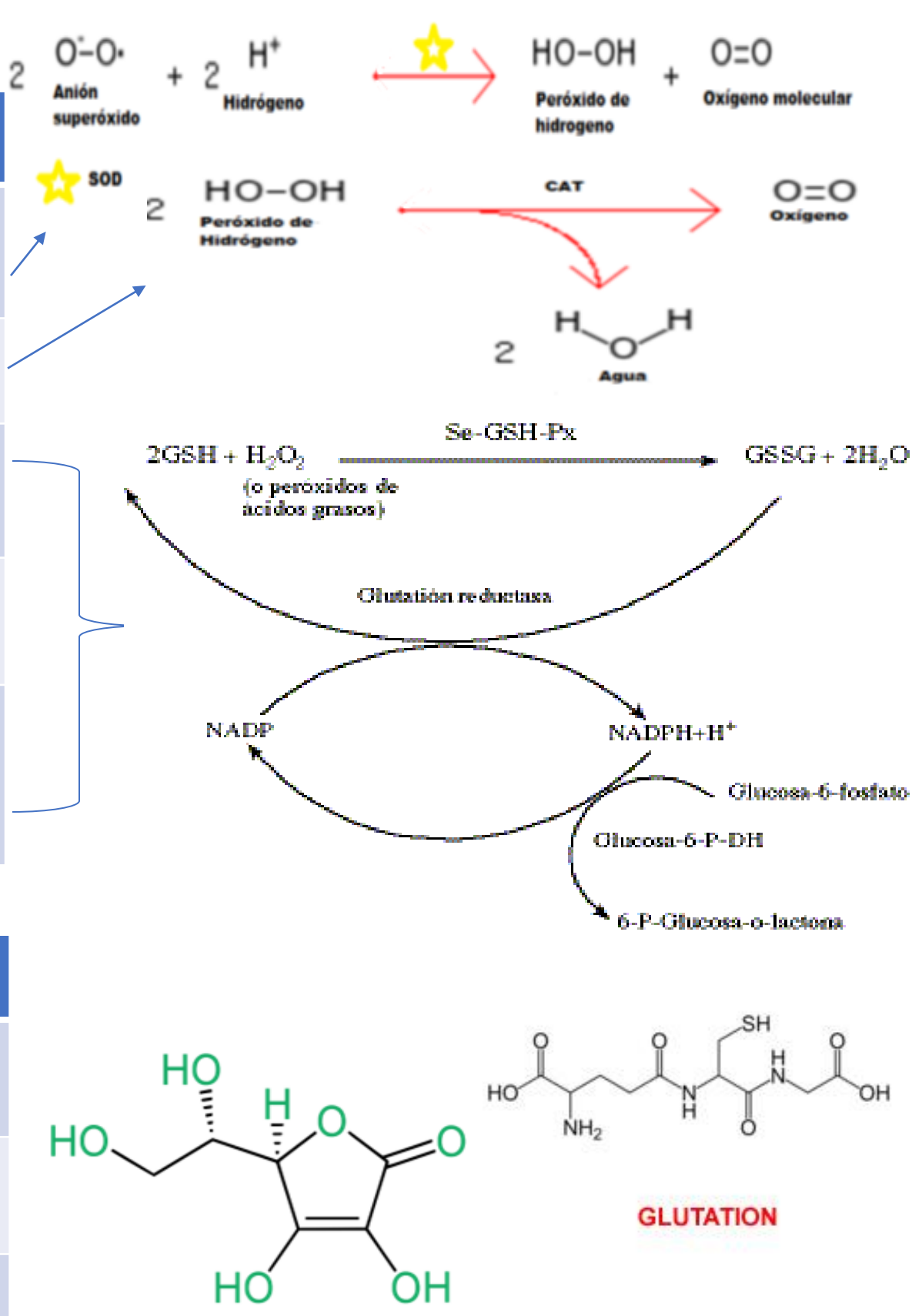
4.1) Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante **ESPECÍFICA** en muestras biológicas:

a) Enzimáticas:

Enzima	Medida	Técnica	Cuantificación	Tipos de muestras
Superóxido Dismutasa	El anión superóxido oxida al cromóforo Azul de nitrotetrazolio. El grado de Inhibición de la reacción es directamente proporcional a SOD.	Espectrofotometría	Abs: λ : 560 nm,	Muestras biológicas
Catalasa	Disminución de la abs correspondiente a descomposición del H_2O_2 .	Espectrofotometría	Abs: λ : 240 nm	Muestras biológicas
Glutacion Peroxidasa	La oxidación de NADPH a NADP+ se acompaña de la disminución de la abs. La tasa de disminución de la abs a λ :340 nm es directamente proporcional a la actividad GPx.	Espectrofotometría	Abs: λ : 340 nm	Muestras biológicas
Glutacion Reductasa	Disminución de abs a λ :340 nm, generada por la oxidación de NADPH o por el incremento en la abs a λ :412 nm generado por la reducción del DTNB	Espectrofotometría	Abs: λ : 340 nm	Muestras biológicas
Glutacion-S-Transferasa	Se utiliza como sustratos: 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y glutatión reducido (GSH), en donde la GST cataliza la conjugación del grupo tiol del glutatión al CDNB. La abs del producto GS-DNB a λ :340 nm, es directamente proporcional a la GST.	Espectrofotometría	Abs: λ : 340 nm	Muestras biológicas

b) No enzimáticas:

Enzima	Medida	Técnica	Cuantificación	Tipos de muestras
Vitamina E	Concentración en la muestra	RP-HPLC+ detección mediante fluorescencia	λ_{exc} :298nm; λ_{em} :328nm	Muestras biológicas (plasma)
Vitamina C	Concentración en la muestra	RP-HPLC+ detector de absorción ultravioleta-visible	λ :254nm	Muestras biológicas (plasma)
Glutacion	Concentración de las dos formas: oxidado (GSSG) y reducido (GSH)	HPLC+ detector UV	λ :365 nm	Muestras biológicas



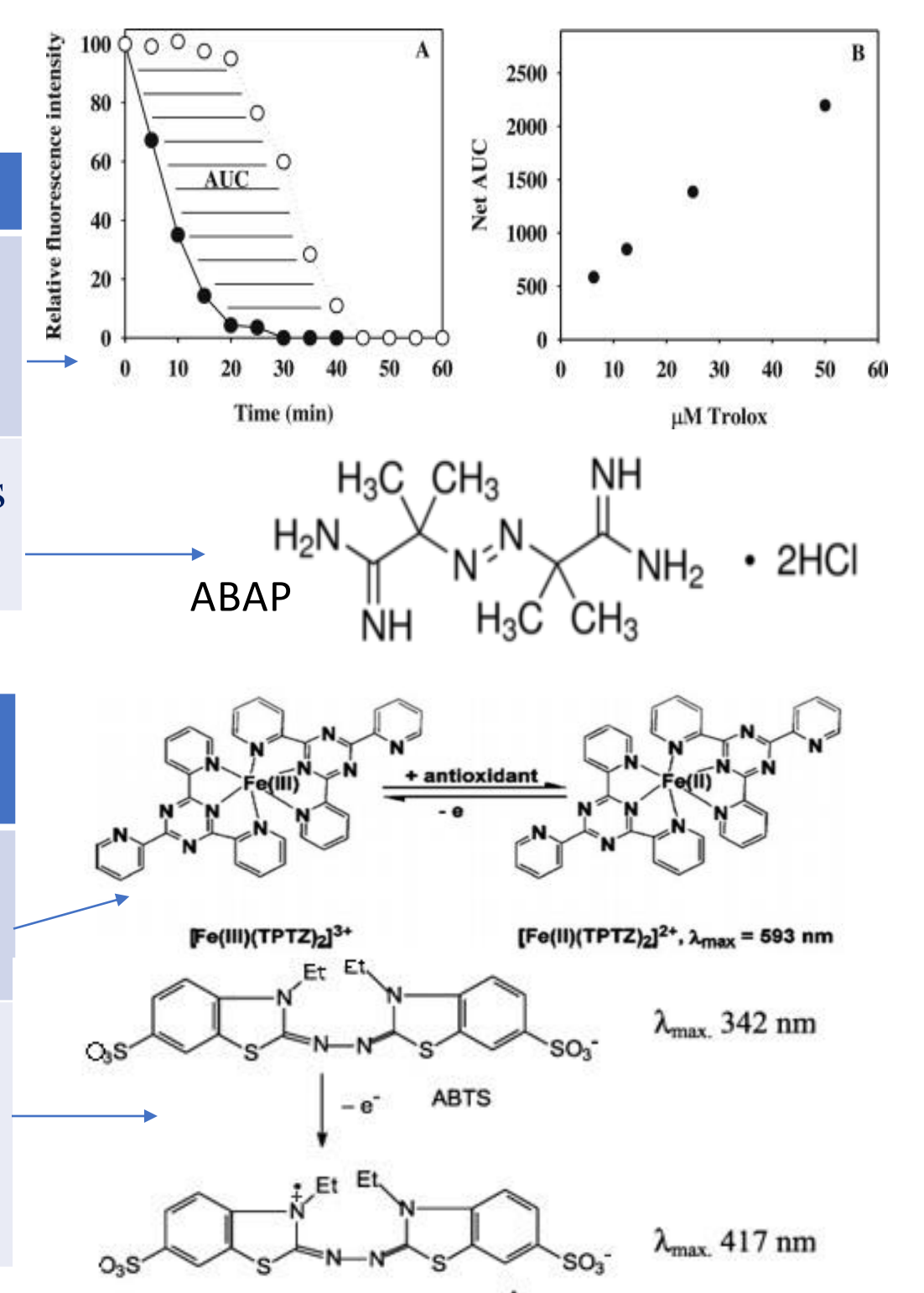
4.2) Métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante **TOTAL** en muestras biológicas:

Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno

Método analítico	Especie iniciadora	Medida	Técnica	Cuantificación	Exp. de resultados	Tipos de muestras
ORAC	AAPH/ H_2O_2 - $CU^{2+}/CuSO_4$	Inhibición de la caída de fluorescencia de PE/FL	Fluorimetría	Fl a λ_{exc} 540 y λ_{em} 565nm técnica AUC	Eq. de Trolox	Alimentos bebidas, muestras biológicas
TRAP	AAPH (radicales peroxilo)	Oxígeno consumido	Electrodo de oxígeno	Longitud de fase de retraso	Eq. de Trolox	Alimentos, muestras biológicas

Métodos basados en la transferencia de electrones (FRAP) y mixtos (ABTS)

Método analítico	Especie iniciadora	Medida	Técnica	Cuantificación	Exp. de resultados	Tipos de muestras
FRAP		Reducción TPTZ- Fe^{3+} a TPTZ- Fe^{2+}	Espectrofotometría	Abs: λ :593nm y calibrado $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$\mu mol Fe^{2+}/L$	Alimentos, bebidas, muestras biológicas
ABTS	Ferrilmioglobina/ $H_2O_2/ K_2S_2O_8$ $\rightarrow ABTS^{*+}$	Descenso de $ABTS^{*+}$	Espectrofotometría	Abs: ABTS: λ :342nm, Abs: $ABTS^{*+}$ λ :417nm	Eq. de Trolox	Alimentos, bebidas, muestras biológicas



5) CONCLUSIÓN

- 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.
- Los procesos oxidativos están relacionados con la etiología, patogenia y complicaciones de ciertas enfermedades.
- 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.
- Baierte, M., Bairos, 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. *Educación 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). \rightarrow Resto de la bibliografía en la memoria.