

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO (ORAC)

1. DEFINICIÓN

El método ORAC consiste en medir la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO). El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo. La proteína usada es la fluoresceína

El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrogeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxil ROO \cdot . Un mol de AAPH, pierde un mol de nitrógeno, para generar dos moles de radical AAPH a una rata constante. En una solución saturada de aire, el radical AAPH reacciona rápidamente con el oxígeno para dar un radical peroxil más estable, ROO \cdot . La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxil. En presencia de un antioxidante, RRO \cdot capta, preferiblemente, un átomo de hidrógeno del antioxidante estable. Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la FL por acción del radical peroxil es disminuida o inhibida.

1.1. OBJETIVO

Determinar la capacidad antioxidante de una muestra.

1.2. ALCANCE

Este procedimiento se podrá utilizar para determinar la capacidad antioxidante de cualquier extracto vegetal, así como también muestras de alimentos.

2. GLOSARIO Y SIGLAS

Fluorescencia: Es un fenómeno por el cual algunas sustancias tienen la capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda, por lo general en el rango ultravioleta, y luego emiten luz en una longitud más larga. Dicho de otra manera, absorben fotones con una determinada energía, y liberan fotones con menor



energía. Este proceso es casi inmediato, la luz es recibida y vuelta a emitir en millonésimas de segundo, por lo tanto podemos decir que la fluorescencia dura tanto como el estímulo, ya que cuando éste cesa, también cesa el fenómeno de fluorescencia.

Antioxidantes: Sustancias que por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir o retardar, en los alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y procesos que llevan a enranciamientos naturales provocados por la acción del aire, luz o indicios metálicos.

TROLOX: Es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol. En virtud de su alta solubilidad en agua y su amplia disponibilidad comercial, el Trolox es universalmente empleado como estándar en las curvas de comparación de diversos ensayos de actividad antioxidante (como ORAC, TEAC).

AUC: Área de fluorescencia bajo la curva.

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihidro-clorido

Na₂HPO₄ 12H₂O: Fosfato de sodio dodecahidratado

NaH₂PO₄ 2H₂O: Fosfato de sodio dihidratado





3. CONTENIDO

3.1. DESCRIPCIÓN

3.1.1. Principio del método

Determinar de la capacidad antioxidante en una muestra determinada.

3.1.2. Rango de trabajo

El método permite determinar los moles equivalentes de Trolox en un rango de 5 a 200 ug/ml, en donde el analito utilizado como referencia tiene un comportamiento lineal. Si las muestras lo requieren deberán ser diluidas para alcanzar una concentración que se encuentre en el rango establecido.

3.1.3. Equipos, reactivos, materiales y elementos de protección

- Espectrofotómetro
- Microplaca Costar UV
- Centrífuga
- Balanza analítica
- Balones volumétricos
- Beakers
- Pipetas, micropipetas y puntas
- Agua destilada
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Solución buffer de Fosfato 10mM
- Fluoresceína $1\mu\text{M}$
- Solución de AAPH 250mM
- Trolox
- Hexano
- Acetona

3.1.4. Puntos de control

El análisis se debe realizar a temperatura ambiente y las muestras deben ser protegidas de la luz y almacenadas a 4 °C luego de su preparación.

3.1.5. Preparación de reactivos

- *Solución buffer de Fosfato 10Mm*: Pesar 0,276g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 0,035g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, llevar a volumen en un balón volumétrico de 100 mL. p
- *Fluoresceína 1 μ M*: Preparar inicialmente una solución de fluoresceína a 1 mM, para esto se debe pesar 3,76 mg de Fluoresceína y se lleva a volumen con la solución buffer de Fosfato en un balón volumétrico de 10 mL (si es necesario calentar a una temperatura no mayor a 50°C). Luego hacer la dilución a 1 μ M según la cantidad que sea requerida para realizar el ensayo.
- *Solución de AAPH 250mM*: Pesar 678 mg y llevar a volumen con solución buffer de fosfato en un balón volumétrico de 10 mL.

3.1.6. Desarrollo del método

1. Pesar exactamente 5 mg de trolox y llevarlos a balón volumétrico de 10 mL, solubilizarlos completamente en la solución buffer de fosfato y llevar a volumen de esta manera se obtiene una solución a 2000 μ M (calentar la solución para diluir mas fácilmente).
2. Se realizan las diluciones respectivas para la curva de trolox tomando 5, 12.5, 25, 50, 75, 100 μ L de la solución anterior y llevando a volumen de 1 mL con agua destilada. Curva 10 – 200 μ g/mL. Si se desea hacer la concentración de 5 μ g/mL se parte de la concentración de 200 μ g/mL tomando 25 μ L para mayor exactitud.
3. Adicionar en estricto orden a cada pozo los siguientes componentes: 150 μ L de fluoresceína, 25 μ L de la dilución respectiva de trolox.
4. Paralelamente preparar un blanco de ensayo que contenga: 150 μ L de fluoresceína y 25 μ L de solución Buffer fosfato.
5. Preincubar durante 30 min a 37°C.
6. Adicionar a cada pozo 25 μ L de solución de AAPH 250mM.

7. La intensidad de la fluorescencia es medida cada 2 min durante 2 horas con longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente.

- **Preparación de la muestra (para muestras sólidas)**

1. Preparar la muestra teniendo en cuenta que para muestras con alto contenido de grasa se debe desengrasar.
2. Filtrar una alícuota de 5 mL a través de una membrana de nylon (0.45 um), almacenar a 4°C y proteger de la luz.
3. Hacer diluciones en agua de 1:10 y/o 1:100

- **Preparación de la muestra (para muestras líquidas)**

1. Tomar 10 mL de muestra y centrifugar a 3000 rpm/15 min para remover residuos sólidos
2. Filtrar una alícuota de 5 mL a través de una membrana de nylon (0.45 um), almacenar a 4°C y proteger de la luz.
3. Hacer diluciones de 1:10 y/o 1:100

3.1.7. Cálculo y reporte de resultados

La protección del antioxidante se mide a partir del área de fluorescencia bajo la curva (AUC) de la muestra en comparación con la AUC del blanco, donde el antioxidante no está presente. La AUC se calcula mediante la siguiente expresión:

$$AUC = \left(0,5 + \left(\sum_{i=1}^{i=31} \frac{f_i}{f_1} \right) \right) \cdot CT$$

Donde:

I=número de ciclos

F=unidades de fluorescencia



CT= tiempo de cada ciclo en minutos. En este caso, CT=2

El área limpia bajo la curva (AUC limpia) se encuentra por diferencia entre el AUC de la muestra y el AUC del blanco. Esta AUC limpia (y) se representa delante de la concentración de Trolox como patrón (X) obteniendo la recta de regresión lineal, a partir de aquí, se calculan los moles equivalentes de Trolox (ET) por litro de muestra.

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} \times \frac{[Trolox]}{[AH]}$$

Donde:

ABC_{AH}: Área bajo la curva en presencia de antioxidante.

ABC_{Trolox}: Área bajo la curva de Trolox.

[Trolox]: Concentración de Trolox.

[AH]: Concentración de Antioxidante.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- Álvarez, R., Carvalho, C., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., Londoño, J. (2011). Citrus Juice Extraction Systems: Effect on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Clementine Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 774-781.
- Alfaro, M.M. (2009). Estudio de reactividad de luteolina en su estado libre y formando complejos de inclusión con ciclodextrinas. Tesis para optar al título de química. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

5. ANEXOS

No aplica

