

VALIDACIÓN DE UN METODO PARA VALORAR POTENCIAL ANTIOXIDANTE  
(ORAC – OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY) EN ALIMENTOS Y  
PRODUCTOS NATURALES

MARÍA ALEJANDRA VELASCO CHACÓN

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
CALI  
2015

VALIDACIÓN DE UN METODO PARA VALORAR POTENCIAL ANTIOXIDANTE  
(ORAC – OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY) EN ALIMENTOS Y  
PRODUCTOS NATURALES

MARÍA ALEJANDRA VELASCO CHACÓN

Proyecto de grado

Dirección: Guillermo León Montoya

Director de programa de Química Farmacéutica

UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
CALI  
2015

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE FIGURAS.....	4
TABLA DE CUADROS.....	5
1 RESUMEN.....	6
2 INTRODUCCIÓN.....	7
3 DESCRIPCIÓN.....	8
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
3.2 MARCO TEORICO .....	9
3.2.1 Consideraciones generales sobre el balance oxidante-antioxidante....	9
3.2.2 Mecanismos antioxidantes .....	10
3.2.3 Métodos para valorar potencial antioxidante.....	11
3.2.4 Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno.....	12
3.2.5 El ácido caféico .....	16
3.2.6 La validación y sus implicaciones en los métodos de análisis. ....	16
3.2.7 Lectores de platos y análisis automatizados de alta capacidad ( .....	18
3.3 OBJETIVOS.....	19
3.3.1 Objetivo General .....	19
3.3.2 Objetivos Específicos .....	19
- Estandarizar el método ORAC, adaptando las condiciones de temperatura y concentración de reactivos encontrados en el laboratorio de la Universidad ICESI, utilizando el ácido caféico como analito. ....	19
- Validar el método analítico basándose en la norma ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano), por medio del cumplimiento de los parámetros de validación. ....	19
4 METODOLOGÍA.....	20
4.1 Preparación de reactivos .....	20
4.2 Preparación de la microplaca .....	21
4.3 Preparación del equipo.....	21
4.4 Evaluación de los datos .....	21
5 RESULTADOS .....	23
5.1 Estandarización .....	23
5.2 Blanco negativo .....	24

5.3	Datos del estándar y el ácido caféico. ....	24
5.4	Muestras .....	31
6	DISCUSIÓN.....	33
7	CONCLUSIONES .....	39
8	RECOMENDACIONES.....	40
9	BIBLIOGRAFÍA.....	5
10	ANEXOS .....	7

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de degradación de la fluoresceína por AAPH.....	13
Figura 2. Estructura del trolox.....	14
Figura 3. Disminución de la fluorescencia en el tiempo del Trolox y el blanco. Se puede observar el área bajo la curva (AUC) entre las dos muestras.....	15
Figura 4. Estructura del ácido caféico.....	16
Figura 5. Disminución de la intensidad de fluorescencia en el tiempo durante la lectura de tres blancos negativos(1,2,3). .....	24
Figura 6. Disminución de la intensidad de fluorescencia después de la adición del AAPH para las diferentes concentraciones de Trolox.....	25
Figura 7. Disminución de la intensidad de fluorescencia después de la adición del AAPH para las diferentes concentraciones de ácido caféico.....	26
Figura 8. Las tres (1,2,3) réplicas para la concentración de 6,25 uM de trolox en el primer día que se llevó a cabo la metodología en horas de la tarde.....	26
Figura 9. Curva de calibración del Trolox.. .....	27
Figura 10. Curva de calibración del Ácido Caféico en AUC vs Concentración. Sextuplicado de datos obtenidos de la curva en 3 diferentes días de experimentación obtenidos de la tabla 2, cada curva por triplicada, evidenciando la baja dispersión de los datos.....	28
Figura 11. Curva de calibración para el ácido caféico en equivalentes trolox por gramo de ácido caféico vs concentración en micromolar de ácido caféico.....	29
Figura 12. Sextuplicado de las curvas de calibración de ácido caféico obtenida a partir de la ecuación tres.....	30
Figura 13. Comparación de los equivalentes de ácido caféico por gramo de muestra de cada tipo de café. Donde uno es la disolución 1/50, dos es la disolución 1/100, tres es la disolución 1/500 y cuatro la disolución 1/1000. ....	32

## TABLA DE CUADROS

Tabla 1. Áreas bajo la curva de cada concentración de trolox utilizada para cada experimentación. A partir de la tabla se obtuvo un promedio de cada concentración para conocer la curva de calibración final para el trolox. ....	27
Tabla 2. Curvas de calibración para el ácido caféico en AUC. ....	28
Tabla 3. Curvas de calibración para el ácido caféico en equivalentes trolox por gramo de ácido caféico. ....	29
Tabla 4. Curva de calibración del ácido caféico en equivalentes trolox por gramo de ácido a partir de la ecuación 3. ....	30
Tabla 5. Equivalentes trolox de cada tipo de café en diferentes concentraciones. (ET: equivalentes trolox por gramo de café) ....	32

## 1 RESUMEN

El objetivo de este proyecto es el desarrollo y validación del método analítico ORAC (capacidad de absorción de radicales libres) para valorar el potencial antioxidante en alimentos y productos naturales. En la actualidad muchos alimentos son clasificados de acuerdo a sus propiedades nutricionales y nutraceuticas. En las últimas décadas el potencial antioxidante ha sido un parámetro que viene siendo protagonista y hoy en día es aceptado como una propiedad nutricional adicional. Definitivamente los laboratorios de la universidad deben contar dentro de su portafolio de métodos analíticos validados para determinar esta propiedad y poder apoyar el sector agrícola y de alimentos del Valle del Cauca. La metodología que se propone está basada en la medición de la capacidad que tienen algunos alimentos y productos naturales de estabilizar radicales libres empleando una sonda fluorescente. Este método que es aceptado por la comunidad científica internacional fue adaptado a las condiciones de los laboratorios de la Universidad.

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químico han de ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurarse que producen resultados válidos, coherentes y reproducibles de acuerdo a su objetivo previsto. Para nuestro método fluorométrico se seleccionaron los parámetros linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección como los de mayor relevancia en la validación. El proceso de validación se realizó cumpliendo los requisitos técnicos señalados en la Norma ICH Q2(R1) (Conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para humanos).

Durante el proceso se obtuvieron datos que verifican que el método ORAC es apto para su aplicación bajo condiciones específicas de trabajo y cumpliendo con todos los parámetros de validación, además se retó el método por medio de la medición de ácido caféico en diferentes muestras de café, permitiendo obtener datos relevantes para próximas investigaciones.

Palabras Clave: *validación, método ORAC, parámetros, Trolox, Ácido Caféico.*

## 2 INTRODUCCIÓN

La presencia de antioxidantes en alimentos que pueden ser encontrados en productos agrícolas colombianos ha permitido llevar a cabo diferentes investigaciones tanto para comprobar su presencia como para realizar su extracción con fines farmacéuticos y para tener elementos de valor diagnóstico que comparen el aporte nutricional de algunos alimentos como frutas y hortalizas.

La presencia de antioxidantes en diferentes alimentos permite la prevención de muchas enfermedades. La principal característica de estas enfermedades es que su etiología se da a lugar por procesos oxidativos mediada principalmente por especies radicalarias. No obstante la formación de radicales libres en el cuerpo es necesaria para llevar a cabo muchos procesos celulares, es realmente el exceso de estos compuestos lo que lleva a desencadenar diferentes estados patológicos. Es por esto que diferentes investigaciones acerca de enfermedades crónicas no transmisibles mediada por procesos oxidativos están encaminadas a identificar sustancias que puedan modificar su transcurso. Los antioxidantes en alimentos, principalmente los de mayor consumo pueden jugar un papel protagónico en el estado de salud de las personas y es de gran importancia que los laboratorios analíticos puedan establecer métodos para definir su aporte.

Colombia es reconocida mundialmente por ser un país agrícola y uno de sus productos más representativos es el café, el cual aparte de poseer un alto contenido de cafeína también posee diferentes tipos de antioxidantes y compuestos polifenólicos. Para realizar la determinación del potencial antioxidante de mezclas multicomponente o de compuestos puros se han reportado muchos métodos, uno de los mejor aceptados internacionalmente es ORAC por sus siglas en inglés (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), el cual se basa en la medición de la capacidad que tienen diferentes muestras para impedir la oxidación. El método consiste en observar la velocidad de oxidación de una sonda fluorescente en presencia de un antioxidante. (Bisby, Brooke, & Navaratnam, 2007).

### 3 DESCRIPCIÓN

#### 3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la medición de la capacidad antioxidante en productos naturales se ha convertido en una importante herramienta en el control de calidad de alimentos, lo que lleva a la necesidad de validar métodos que permitan medir y comparar la capacidad entre alimentos y productos, además de proveer estándares para conocer el efecto de estos en la salud. Es por esto que se han desarrollado diferentes metodologías que determinan la capacidad que tienen los alimentos para inhibir la degradación oxidativa, esta gran variedad se debe a lo complejo del sistema y la diversidad de antioxidantes y radicales libres existentes, por lo cual que no se ha encontrado un método que unifique los requisitos para analizar la capacidad antioxidante total de las muestras (Londoño, 2012). Sin embargo el método ORAC es uno de los más empleados ya que además de ser adaptable a los diferentes cambios que puede haber entre laboratorios, se lleva a cabo en condiciones muy similares a las fisiológicas y el radical libre utilizado es uno de los más relevantes biológicamente.

Es así como la validación de esta metodología en las instalaciones de la Universidad CES llevaría al desarrollo y adaptación de un método reconocido internacionalmente el cual puede ser utilizado para realizar mediciones en los productos agrícolas más representativos del Valle del Cauca, permitiendo prestar el servicio a las industrias y a los productores de alimentos para que lleven a cabo la medición y comparación de la capacidad antioxidante que pueda distinguirlos en el mercado, además de darle un valor agregado a sus productos.

## 3.2 MARCO TEORICO

### 3.2.1 Consideraciones generales sobre el balance oxidante-antioxidante

El daño oxidativo que se genera por el tiempo y por las diversas vías de metabolismo realizadas por la célula, genera que muchos investigadores se dediquen a estudiar el efecto de los antioxidantes en diferentes patologías como cáncer, diabetes, exposición a la radiación e incluso a procesos naturales como el envejecimiento. Todas las patologías están asociadas principalmente a un aumento de las especies oxidantes a lo que comúnmente se le denomina como el “estrés oxidativo” (Vidal, y otros, 2001).

El estrés oxidativo es producido por un desbalance entre la producción de radicales libres y los mecanismos antioxidantes generando un incremento de especies radicalarias. Una de las formas de detener este desbalance es la ingesta de antioxidantes que permite que se dé una disminución en la cantidad de radicales libres.

Las principales especies oxidantes son las especies Reactivas del Oxígeno (ROS), tales como anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Estas especies reactivas del oxígeno se generan continuamente en las células en pequeñas cantidades por medio de procesos celulares como la señalización celular, relajación muscular, el peristaltismo, fagocitosis, etc. Estas especies producidas son altamente tóxicas llevando a que la célula pierda su funcionalidad (Venereo, 2002).

Las investigaciones sobre la influencia de la ingesta de antioxidantes en la dieta para disminuir las enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo se comenzó décadas atrás, lo que llevó al desarrollo de estudios para conocer la actividad de los antioxidantes durante este proceso. Se cree que estos compuestos están asociados a varios mecanismos principalmente la inhibición de procesos de reacción en cadena por radicales libres, en la cual el antioxidante presenta alta reactividad con éstos recibiendo el nombre de antioxidante terminador de cadena. También algunas moléculas pueden poseer actividad estabilizadora de radicales libres la cual se determina por la capacidad que tiene el antioxidante para reaccionar con las especies oxidativas y esto se puede identificar por medio de la velocidad de la reacción, y finalmente está la capacidad antioxidante la cual es la capacidad que tienen este tipo de moléculas para restaurar la degradación oxidativa (Gülçin , 2005).

La actividad antioxidante se ve determinada por la capacidad de llegar al sitio de reacción y la estabilización de los productos formados después del proceso de oxidación y de los radicales libres.

### 3.2.2 Mecanismos antioxidantes

El estrés oxidativo ha llevado a que las células generen un mecanismo de defensa por medio de la producción de moléculas que permitan disminuir la presencia de las especies radicalarias. El sistema de defensa enzimático es uno de los principales desarrollados por las células y puede dividirse especialmente en dos grupos, las catalasas que son enzimas presentes en las células animales y vegetales que se encuentran en los peroxisomas donde presentan la capacidad de convertir moléculas que son precursoras de radicales como el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua (Londoño, 2012).

Otra enzima es la superóxido dismutasa, la cual actúa como antioxidante en procesos de disminución de la presencia de  $O_2^{\cdot-}$  a especies menos reactivas. Para que esta proteína pueda realizar los procesos es necesario un cofactor que la active que depende del sitio celular donde se encuentre, en el citosol por ejemplo las enzimas requieren por cofactor el zinc y el cobre, mientras en la mitocondria se tienen cofactores como el manganeso, sin embargo a pesar de estas diferencias su acción es la misma (Londoño, 2012).

Otra forma de defensa contra las especies radicalarias son los antioxidantes no enzimáticos obtenidos a partir de la dieta. Uno de los más importantes es la vitamina E, la cual tiene dos tipos de conformación donde la más abundante es el alfa-tocoferol que presenta actividad antioxidante en la membrana celular por medio de la estabilización de radicales peroxilo, esto se lleva a cabo por la donación del hidrógeno fenólico responsable de la actividad estabilizadora de radicales libres y una cadena carbonada que le permite la interacción con la membrana bilipídica, además su estructura permite que la donación del hidrógeno a los radicales libres genere una vitamina E estable, debido a que el electrón desapareado puede deslocalizarse dentro del anillo aromático.

El ácido ascórbico hace parte de las moléculas que interactúan para disminuir el estrés oxidativo, esto lo realiza por medio de la actuación en conjunto con antioxidantes primarios en medios acuosos como lo son los fluidos oculares, el espacio intersticial entre otros medios acuosos presentes en el organismo. La vitamina C actúa en conjunto con la vitamina E (alfa-tocoferol) regenerando el radical alfa-tocoferilo en alfa-tocoferol, esto se puede llevar a cabo gracias a que en su estructura permite generar la donación de dos electrones para la estabilización de las especies radicalarias.

En este grupo también se encuentran los flavonoides, compuestos fenólicos presentes en plantas que se encuentran clasificados según su estructura en diferentes grupos como flavonas, flavononas, flavonoles, catequinas, antocianidas, auronas e isoflavonoides, esta variedad permite que sean

los antioxidante con mayor consumo en la dieta ya que se encuentran en la mayoría alimentos y plantas. Los flavonoides han demostrado tener una alta capacidad antioxidante por medio de la donación de electrones o átomos de hidrógeno en métodos *in vitro*, sin embargo en el organismo presentan deficiencia en la absorción y baja biodisponibilidad por su rápida eliminación. Su principal acción como antioxidante se encuentra en la estabilización de radicales libres derivados de lípidos que pueden llegar a regenerarse por la acción del ácido ascórbico.

#### *Antioxidantes donadores de protones*

La capacidad antioxidante se lleva a cabo por dos tipos de mecanismos dependiendo de la estructura del antioxidante, uno de los métodos se basa en la transferencia de átomos de hidrogeno donde se mide la capacidad que tiene la molécula para transferir un átomo de hidrógeno a un radical libre estabilizándolo, esto depende de la energía de disociación del enlace del grupo funcional que contiene el hidrogeno. Es decir entre más baja sea la energía de disociación más rápido va a actuar el antioxidante impidiendo la oxidación del sustrato. El radical obtenido a partir de la donación del hidrogeno debe de ser tan estable que no reaccione con el sustrato y tener la capacidad de regenerarse por la acción de otra molécula. Este mecanismo se presenta en moléculas que tiene una energía de disociación menor a 10 Kcal/mol por lo cual las reacciones son rápidas e independientes del pH pero sensibles a la presencia de metales que puedan potenciar la acción. (Londoño, 2012)

#### *Antioxidantes donadores de electrones*

El método de transferencia de electrones se basa en medir la capacidad que tiene un antioxidante para transferir un electrón con el fin de reducir un compuesto, por lo cual depende del potencial de ionización ya que se genera una desprotonación de la molécula. Al depender de esta variable el pH es de gran influencia para llevar a cabo la reacción ya que este mecanismo se ha relacionado con el potencial redox que posee la molécula. Además al igual que el mecanismo de transferencia de átomos de hidrogeno, es sensible a la presencia de metales generando interferencia. (Londoño, 2012)

### 3.2.3 Métodos para valorar potencial antioxidante

Actualmente la medición de la capacidad antioxidante hace parte de una de las herramientas para medir la calidad de los alimentos y productos nutricionales, por lo cual el método para medir esta capacidad se espera que sea útil para usar radicales libres biológicamente relevantes, que se conozca el mecanismo de acción de los antioxidantes sobre las especies reactivas, la metodología sea simple y

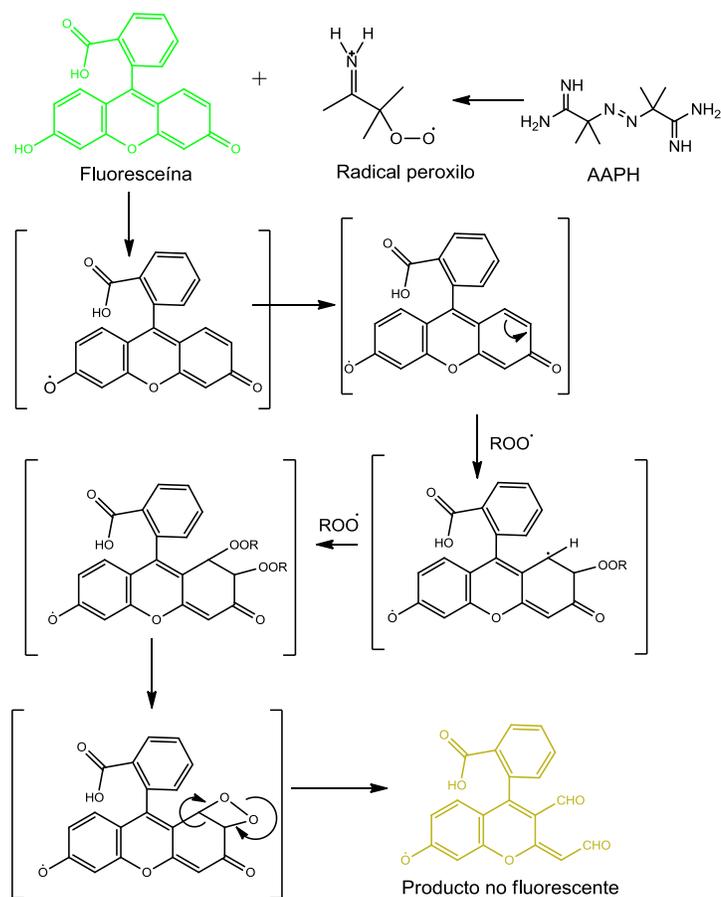
pueda llevarse a cabo por medio de instrumentación disponible, además de ser adaptable a cualquier tipo de antioxidante (hidrofílico y lipofílico).

Sin embargo no se ha encontrado la manera de unificar todos los requerimientos debido a la complejidad del sistema y la diversidad de antioxidantes, radicales libres y sustratos que deben ser evaluados obligando al desarrollo de diferentes métodos. Es por esto que se han realizado diferentes clasificaciones para los métodos con el fin de reconocer a qué tipo de moléculas están dirigidos. Una de las clasificaciones se basa en definir los métodos en directos e indirectos, los métodos directos se basan en la medición de la capacidad para retardar la degradación oxidativa de un antioxidante especialmente la inhibición de la peroxidación lipídica pues es la oxidación más abundante en el organismo. Mientras los indirectos estudian la habilidad que tienen los antioxidantes para estabilizar los radicales libres. No obstante otra clasificación utilizada es según el mecanismo de acción por el cual se realiza el proceso antioxidante.

A pesar de la variedad, uno de los métodos más utilizados es ORAC ya que además de medir la capacidad antioxidante permite simular el pH fisiológico y trabajar con el radical libre más abundante en el organismo (el radical peroxilo). Sin embargo el método tiene la posibilidad de determinar la capacidad antioxidante para moléculas hidrofílicas basándose en el mecanismo de actividad mediada por antioxidantes terminadores en cadena a través de la transferencia de átomos de hidrogeno.

#### 3.2.4 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

La medición de la capacidad antioxidante de diferentes productos se realiza por medio del método ORAC, el cual mide la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo generados por AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)-dihidrocloruro), donde por medio de una descomposición térmica produce nitrógeno molecular y radicales alquilo que en contacto con el oxígeno generan el radical peroxilo (figura 1). (Zulueta , Esteve, & Frigola, 2009)

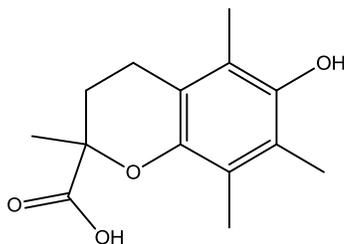


**Figura 1. Mecanismo de degradación de la fluoresceína por AAPH.** Al estar en contacto la fluoresceína con el radical libre generado a partir de la exposición del AAPH a 37°C, se da la donación del átomo de hidrogeno del grupo fenólico formando una fluoresceína estable, además el radical puede interactuar con el doble enlace conjugado a partir del cual por descomposición genera el producto final sin fluorescencia. (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001)

Una vez formado el radicalperoxilo reacciona con la fluoresceína a través de mecanismo que aún no se conocen completamente. Ou y colaboradores hicieron una propuesta de mecanismo de degradación y pérdida de la fluorescencia de esta sonda (figura 1). Las sustancias incorporadas a la reacción que tienen la posibilidad de disminuir la velocidad de oxidación y degradación de la sonda fluorescente, demostraran su potencia en la medida que se disminuya su concentración en el medio de reacción y persista su capacidad de proteger la fluoresceína. (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001)

Para efectos de comparación debemos emplear una molécula que sea aceptada universalmente como antioxidante. La vitamina E es una sustancia de carácter lipofílico que se adiciona a muchos alimentos preparados para retardar los

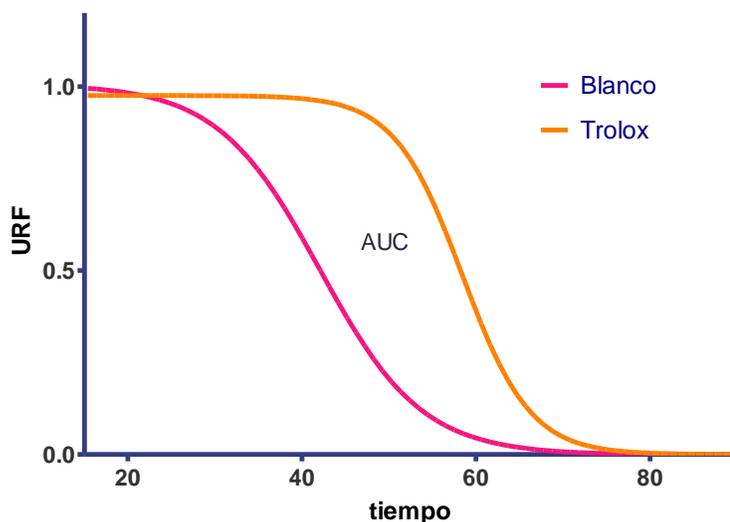
procesos de oxidación, sin embargo debido a que es una sustancia que no es soluble en medios acuosos debemos tener otras sustancias alternas para evaluar este mecanismo de reacción que se da en medios acuosos. Hace más de una década que han venido siendo publicados artículos del potencial antioxidante en alimentos y se convirtió en una generalidad el trabajar con un compuesto que es estructuralmente similar a la vitamina E porque es fácilmente solubilizado en medios acuosos, ese compuesto es denominado trolox cuyo nombre IUPAC es 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico. (Figura 3). Este compuesto ha permitido que muchos alimentos y productos naturales sean fácilmente comparables en su capacidad antioxidante al ser expresados todos de la misma manera (Brescia, 2012).



**Figura 2.** Estructura del trolox.

La cinética de degradación de la sonda fluorescente se compara contra la cinética de degradación en presencia de una sustancia que retarde este proceso. La diferencia entre ambas reacciones está ilustrada en la figura 3. La disminución de la velocidad de degradación está definida y cuantificada por el área generada entre ambas cinéticas y descrita como área bajo la curva.

### Perdida de la fluorescencia en el tiempo



**Figura 3.** Disminución de la fluorescencia en el tiempo del Trolox y el blanco. Se puede observar el área bajo la curva (AUC) entre las dos muestras.

A partir de las unidades relativas de fluorescencia es posible realizar el cálculo del área bajo la curva (AUC) por medio de la ecuación 1 donde  $f_n$  es la lectura de la fluorescencia en tiempo  $n$  y  $f_1$  es la primera lectura de fluorescencia en tiempo cero. Con estos datos se puede comparar a la capacidad antioxidante entre concentraciones de una misma muestra.

Finalmente para tener datos comparables es necesario conocer los Equivalentes Trolox (ET) que es una medida universal empleando este compuesto. Este valor puede ser obtenido por medio de la ecuación 2, donde  $C_{trolox}$  es concentración de Trolox a  $20 \mu\text{M}$ ,  $k$  es el factor de dilución de la muestra y  $AUC_{muestra}$ ,  $AUC_{trolox}$  (a  $20 \mu\text{M}$ ) y  $AUC_{blanco}$  es el área bajo la curva de la muestra, trolox y blanco respectivamente.

$$AUC = (0,5 + \sum \frac{f_n}{f_1}) \times 5$$

**Ecuación 1:** Obtención del área bajo la curva a partir de los datos de fluorescencia relativa (Zulueta, Esteve, & Frigola, 2009)

$$equivalentes\ Trolox = \frac{C_{Trolox} (AUC_{muestra} - AUC_{blanco}) k}{(AUC_{Trolox} - AUC_{blanco})}$$

**Ecuación 2:** Obtención de equivalentes Trolox (Zulueta, Esteve, & Frigola, 2009)

Al obtener los datos es posible realizar diferentes comparaciones de la capacidad antioxidante entre los diferentes tipos de compuesto que disminuyen la oxidación,

sin embargo hay que tener en cuenta que en muestras como productos naturales y alimentos no se tiene únicamente un antioxidante, por lo cual al realizar los cálculos se obtiene la capacidad antioxidante total.

### 3.2.5 El ácido caféico

El ácido caféico es un ácido orgánico ubicuo que tiene un gran potencial antioxidante y hace parte de los denominados compuestos fenólicos los cuales son metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas. La síntesis de este ácido se genera a partir de la vía del Shikimico, (Gülcin , 2005) la cual es de gran importancia para la formación de metabolitos secundarios en la síntesis de aminoácidos aromáticos.

El Ácido Caféico es muy utilizado en los procesos de verificación de la capacidad antioxidante y regulación del equilibrio oxidativo de la célula por su alta capacidad reductora de radicales libres. (Gülcin, 2005)

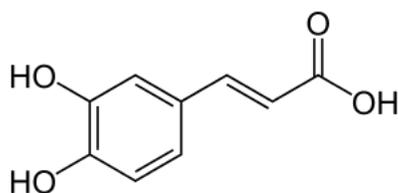


Figura 4. Estructura del ácido caféico.

El uso de este antioxidante permite conocer la concentración relativa en diferentes muestras en las que sea evidenciada su presencia, ya que al poseer una gran capacidad para disminuir el estrés oxidativo es muy llamativo para los investigadores pues se encuentra en gran variedades de café y otros productos naturales. La presencia de este ácido en la dieta lleva a que sea adsorbido con facilidad y permita ejercer una función mucho más rápida en el cuerpo.

### 3.2.6 La validación y sus implicaciones en los métodos de análisis.

Para las entidades internacionales como la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *International Conference on Harmonisation* es necesario realizar la validación de métodos analíticos para demostrar que los resultados son confiables y aceptados, verificando así, que el laboratorio tiene las condiciones adecuadas para que se pueda llevar a cabo. (ICH Q2R1: ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE "VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY")

La validación de un método analítico se define según la USP como el procedimiento por el cual por medio de estudios se establecen parámetros de desempeño en los cuales se cumple con los requisitos para próximas operaciones. Además en la ICH establece que los parámetros analíticos que se consideran para llevar a cabo una validación son la exactitud, linealidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y robustez.

No obstante para comenzar la validación, es necesario estandarizar la metodología antes de evaluar los criterios ya mencionados. Se debe de conocer y describir los pasos necesarios para llevar a cabo el método analítico, como tipos de muestras, estándares y reactivos, implementos de laboratorio y las variables que se deben controlar para llevar a cabo el método. Una vez implementado esto se puede comenzar con la validación por medio de la comprobación de los parámetros analíticos.

### *Exactitud*

La exactitud describe como el grado de dispersión de un valor obtenido respecto al valor nominal o conocido bajo las condiciones de análisis establecidas. Se lleva a cabo por medio de la aplicación del método con un analito de pureza química conocida, ya que así se puede tener la certeza del resultado que se va a obtener, en este caso son muy usados los estándares USP. (Aguirre, y otros, 2001)

### *Precisión*

La precisión de un método analítico se demuestra a través del grado de concordancia entre los datos obtenidos a partir de un número suficiente de alícuotas que parten de una muestra homogénea en condiciones establecidas. (ICH, 2014) Esta toma de datos se lleva a cabo con el fin de obtener la menor desviación estándar posible de los datos y por lo tanto conocer la variabilidad del método. Además puede ser medida bajo criterios de reproducibilidad y repetitividad.

Para la reproducibilidad, se basa en el uso del método analítico en diferentes laboratorios, mientras la repetitividades la realización del método por el mismo analista en un mismo laboratorio obtenidos en cortos periodos de tiempo. También se puede medir por precisión intermedia, donde se dan las variaciones de tiempo como horas, días, diferencia de equipos y analistas. (ICH, 2014)

### *Límite de detección y cuantificación*

Otro parámetro a realizar, es el límite de detección, que determina la cantidad mínima de muestra que el método analítico puede detectar mas no cuantificar en condiciones específicas. (Aguirre, y otros, 2001) Por su parte, el límite de cuantificación, es la cantidad mínima que se puede usar para cuantificar la

muestra, esta concentración de analito debe de estar bajo condiciones específicas y cumplir con una adecuada precisión y exactitud.

### *Rango lineal*

La linealidad es el parámetro donde se describe la capacidad del método de producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito. Estos datos deben de encontrarse dentro de los rangos obtenidos por el límite de cuantificación y de detección.

### *Selectividad*

Por último, la especificidad, es la capacidad de evaluar un analito de interés en presencia de los componentes que pueden estar dentro de la matriz pero que no son de importancia para la medición. (Aguirre, y otros, 2001)

Es importante tener en cuenta, que no siempre es necesario el cumplimiento de todos los parámetros, pues dependiendo del método a evaluar puede o no aplicar algunos para llevar a cabo la validación.

### 3.2.7 Lectores de platos y análisis automatizados de alta capacidad (

El procedimiento anterior se llevará a cabo por medio un lector de platos usando un monocromador de marca Biotek (Sinergy H1), el cual permite hacer lecturas en formato de platos de 96 pozos donde por pozose dispensan entre 100 y 200  $\mu\text{L}$ , permitiendo que la cantidad de muestra a usar sea mínima así como la generación de residuos.

El lector está basado en monocromadores que permiten trabajar con diferentes longitudes de onda de excitación o emisión(Biotek Instruments, Inc, 2014), este realiza mediciones de la fluorescencia de las muestras. También es relevante mencionar que un lector de platos permitela modificación del ambiente según el tipo de muestra y las condiciones que se requieran en el ensayo por medio del control y la verificación de la temperatura y la agitación, permitiendo ser adaptados a los requerimientos de la investigación. El control de estos factores permite que las investigaciones se realicen mucho más rápido, con mayor precisión y generando un porcentaje de error mucho más bajo.

Además de medir unidades relativas de fluorescencia, el equipo mide cinéticas y demás reacciones químicas a temperaturas y tiempos determinados en tan solo segundos, permitiendo que los ensayos se realicen en corto tiempo y con un margen de error pequeño.

### **3.3 OBJETIVOS**

#### 3.3.1 Objetivo General

Validar el método fluorométrico ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) para valorar la capacidad antioxidante en alimentos y productos naturales a través de un Lector de microplacas.

#### 3.3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar el método ORAC, adaptando las condiciones de temperatura y concentración de reactivos encontrados en el laboratorio de la Universidad ICESI, utilizando el ácido caféico como analito.
- Validar el método analítico basándose en la norma ICH (Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano), por medio del cumplimiento de los parámetros de validación.

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Preparación de reactivos

1. Preparación de la solución buffer de Fosfato de Potasio a 75Mm a pH 7.
2. Preparar una solución madre de Fluoresceína pesando 44 mg de Fluoresceína disueltos en 100mL de solución buffer. Mantener en refrigeración constante y en oscuridad.
3. A partir de la solución madre de Fluoresceína, preparar una dilución de 78nM. Tomar 167 $\mu$ L de solución stock y diluir en 25 mL de solución buffer.
4. Pesar 0,299 g de AAPH y llevar a 5mL con solución buffer, para obtener una solución de AAPH (radical) de 221mM.
5. Para preparar la solución madre de Trolox, pesar 2,46mg y llevar a 5 mL con solución buffer.
6. A partir de la solución madre de Trolox se debe construir una curva de calibración con concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu$ M.
7. Preparar una solución madre de ácido caféico, pesar 18 mg y llevar a 100 mL con solución buffer. Antes de completar el volumen, llevar la solución por 5 minutos al sonicador para homogenizar.
8. A partir de la solución madre de ácido caféico, se realiza una curva de calibración con concentraciones de 12.50, 6.25, 3.12 y 1.56  $\mu$ M.

### 4.2 Preparación de las muestras

Es necesario tener en cuenta que las muestras utilizadas para llevar a cabo la metodología, deben de ser hidrófobas puesto que la disolución se lleva a cabo con la solución buffer, además se debe garantizar la homogeneidad de las soluciones utilizando el sonicador. La preparación de las muestras se lleva a cabo de igual manera que las otras soluciones, teniendo en cuenta los cálculos necesarios para realizar las diluciones. Para la preparación de las muestras de café se realizó:

1. Por medio de una cromatografía de capa fina identificar la presencia de ácido caféico en cada una de las muestras.
2. Pesar 50mg de cada café y diluir con la solución buffer en un matraz de 10 mL.
3. Llevar al sonicador para garantizar la homogeneidad de la muestra.

4. Realizar las diluciones de 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000 para cada variedad de café.

#### 4.2 Preparación de la microplaca

Para realizar este proceso es necesario reconocer los pozos (anexo 1). Es importante tener en cuenta que la adición del AAPH se realiza luego de 15 minutos de incubación.

1. *Pozo con estándar o muestra*: adicionar 75µL de la dilución de Trolox, ácido caféico o muestra, 75 µL de Fluoresceína (78nM) y 50 µL solución de AAPH.
2. *Pozo blanco positivo*: adicionar 75 µL de solución buffer, 75 µL de Fluoresceína (78nM) y 50 µL solución de AAPH.
3. *Pozo blanco negativo*: adicionar 125 µL de solución buffer y 75 µL de Fluoresceína (78nM).

#### 4.3 Preparación del equipo

1. Configurar el equipo para que mida la intensidad relativa de fluorescencia, utilizando un rango de emisión de 520- 530 nm y de excitación de 485 - 490 nm. (Bisby , Brooke, & Navaratnam, 2007)
2. Llevar el equipo a 37°C.
3. Incubar el plato con los reactivos durante 30 minutos.
4. Añadir la solución de AAPH en los respectivos pozos.
5. Realizar mediciones por 2 horas, en las cuales se toma datos cada 3 minutos.
6. Obtención de resultados

#### 4.4 Evaluación de los datos

1. Calcular el área bajo la curva de cada muestra con la ecuación 1
2. Para optimizar los resultados, restar el AUC del blanco negativo a cada una de las lecturas.
3. Calcular los equivalentes Trolox de las muestras por medio de la ecuación 2.

4. Obtener las curvas de calibración de cada estándar.
5. Interpolar en la curva de calibración del estándar para encontrar la concentración.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estandarización

Después de la revisión bibliográfica de reportes científicos donde fue empleado el método ORAC, comenzamos un trabajo de estandarización y adaptación de las condiciones que se tienen en el laboratorio de Instrumentación química de la Universidad, teniendo en cuenta que el lector de platos y la óptica de cada equipo obligan a realizar modificaciones en aras de lecturas más reproducibles y menos dispersas.

Para llevar a cabo la estandarización se identificó inicialmente los puntos críticos del procedimiento para lo cual se hicieron pruebas preliminares hasta obtener una metodología definida. Se determinó como estándar el trolox, como componente a validar la molécula pura de ácido caféico y como muestras tres tipos de café (café orgánico, café regular y café descafeinado).

Las primeras variables que se tuvieron en cuenta fueron las del equipo, como los rangos de emisión y excitación y la temperatura en las que se va a realizar la lectura, definiendo 520 y 490 respectivamente mientras la temperatura es de 37°C, la cual debe permanecer constante durante todo el procedimiento puesto que permite la formación del radical libre. Además se tuvo en cuenta el volumen de los reactivos en cada pozo, puesto que se evidenció que entre menor sea el volumen usado mayor cantidad de variabilidad entre los datos, por lo cual se decidió llevar al doble los volúmenes con respecto a los registrados en la literatura, permitiendo que la desviación de los datos fuera mucho menor.

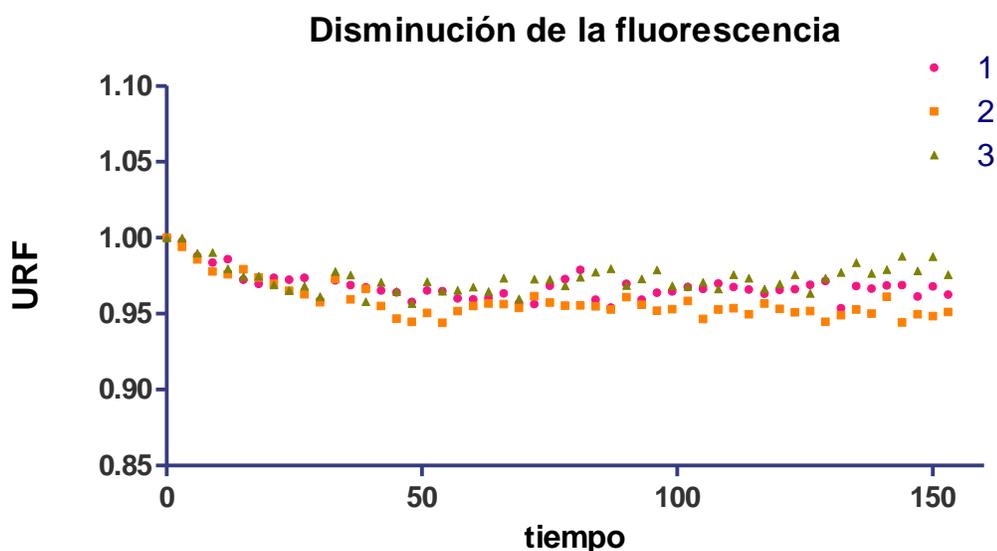
El proceso de agitación de la micriplacase confirmó que es necesario, puesto que la homogenización de los reactivos en cada pozo es de vital importancia para que se den las reacciones. También se consideró el tiempo de seguimiento de la cinética de degradación, definiendo este de dos horas puesto que es el tiempo en el cual se genera la pérdida de fluorescencia total de la concentración más alta del estándar.

Una vez estandarizada la metodología, se procedió a realizar la experimentación seis veces permitiendo ver la influencia de las diferentes condiciones ambientales en los resultados, puesto que las lecturas se realizaron durante tres días en diferentes horas. Las concentraciones de cada reactivo se leyeron por triplicado con la finalidad de evidenciar si se encuentra dispersión en los datos, además se tuvo en cuenta la pérdida de fluorescencia por acción del radical cuando no hay antioxidante, a estos pozos se le nombro blanco positivo y se realizó un blanco negativo para conocer la pérdida de fluorescencia por acción del tiempo.

## 5.2 Blanco negativo

A partir de las lecturas se obtienen las unidades relativas de fluorescencia (URF), las cuales nos permiten observar por medio de graficas como se disminuye la fluorescencia dependiendo del pozo al que se le estén analizando los datos.

En un principio se tuvieron en cuenta las URF obtenidos de los blancos negativos, puesto que a partir de ellos se genera una corrección de los de más datos, ya que a pesar del manejo adecuado de la fluoresceína para que no esté en contacto directo con la luz se da pérdida de fluorescencia.



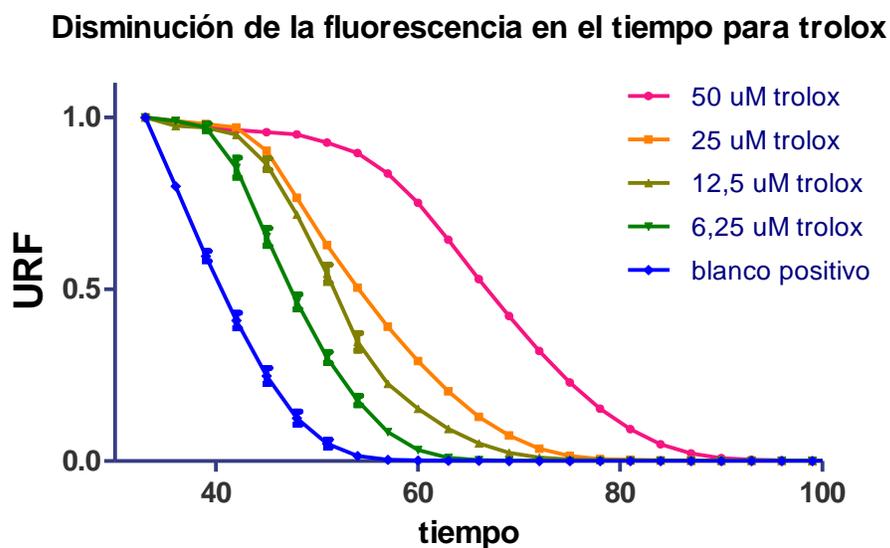
**Figura 5.** Disminución en de la intensidad de fluorescencia en el tiempo durante la lectura de tres blancos negativos(1,2,3). El lector de platos permite obtener datos de unidades relativas de fluorescencia (URL), permitiendo observar la pérdida de la fluorescencia por acción del ambiente por mas que se lleven a cabo condiciones de oscuridad durante la metodología.

## 5.3 Datos del estándar y el ácido caféico.

Para el trolox se definieron cuatro diferentes concentraciones por triplicado a 6.25, 12.5, 25 y 50  $\mu\text{M}$ (Huang , Ou, Flanagan , Hampsch-Woodill, & Prior, 2002), obteniendo así una curva de calibración por cada experimentación. En el caso del ácido caféico las concentraciones evaluadas son diferentes, estas se tuvieron en cuenta por medio de la revisión bibliográfica donde las concentraciones están

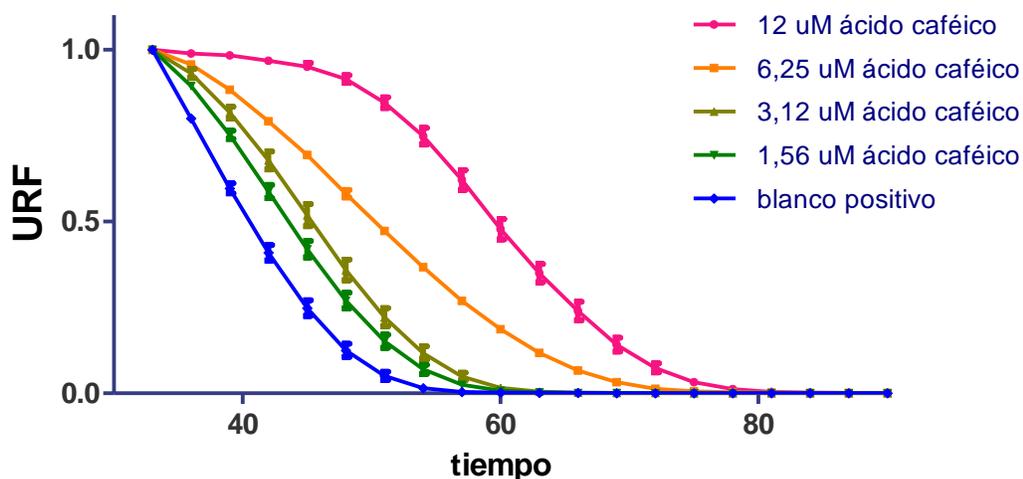
entre el rango de 1.56 a 12.5  $\mu\text{M}$  (Huang , Ou, Flanagan , Hampsch-Woodill, & Prior, 2002).

Se analizaron por separado los datos de trolox y de ácido caféico, observando en la figura 6 la lectura de las cuatro concentraciones del estándar y un blanco positivo mientras en la figura 7 se encuentran los datos del ácido caféico, donde se evidencia la influencia de la concentración con respecto a la oxidación de la fluoresceína, puesto que a mayor concentración mayor tiempo para la pérdida de fluorescencia. En las gráficas se puede observar que comienzan a partir de treinta minutos después de la adición del AAPH, puesto que a partir de este punto es cuando se observa el comienzo de la cinética.



**Figura 6.**Disminución de la intensidad de fluorescencia despues de la adición del AAPH para las diferentes concentraciones de Trolox. Se realizaron cuatro concentraciones y el blanco positivo,obteniendo las unidades relativas de fluorescencia para cada una frente al tiempo.

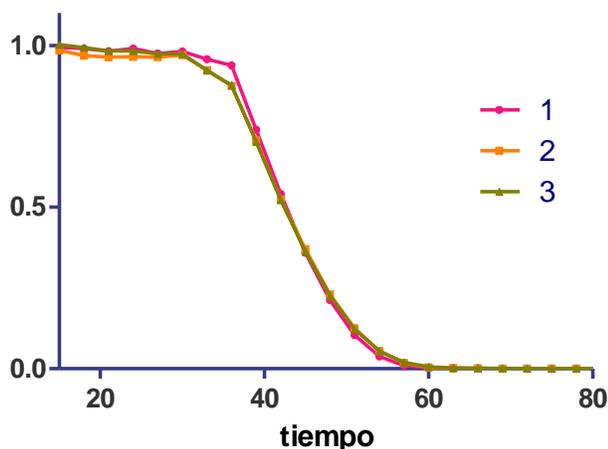
### Disminución de la fluorescencia en el tiempo para el ácido caféico



**Figura 7.**Disminución de la intensidad de fluorescencia despues de la adición del AAPH para las diferentes concentraciones de ácido caféico.Se realizaron cuatro concentraciones y el blanco positivo,obtenindo las unidades relativas de fluorescencia para cada una frente al tiempo.

Como se mencionó antes cada concentración se realizó por triplicado, por lo cual se obtuvo la gráfica 8, donde los datos de cada replica se sobreponen, esto permite verificar la baja desviación; en el caso de la concentración 6,25 uM se puede concluir que a pesar de ser la concentración menor utilizada para el estándar, los datos presentan baja variación.

### Réplicas para 6,25 $\mu$ M de Trolox

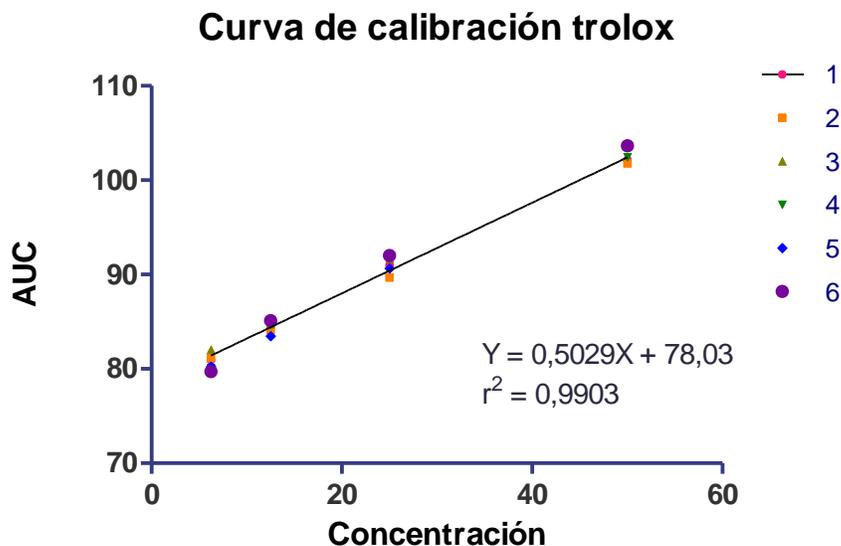


**Figura 8.**Las tres (1,2,3) réplicas para la concentración de 6,25 uM de trolox en el primer día que se llevó a cabo la metodología en horas de la tarde.

A partir de las unidades relativas de fluorescencia se calculó el área bajo la curva para cada una de las concentraciones, obteniendo tres curvas de calibración, las cuales se sobreponen evidenciando la repetitividad de los puntos. Una vez obtenida el área bajo la curva, por medio del promedio de los datos se obtuvo una curva de calibración final para el trolox, con una ecuación de la recta de  $Y=0,5029X+78,03$  y un coeficiente de determinación de 0,9903.

Muestra	Concentración	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	Día 3	Día 3	Promedio	S
		(am)	(pm)	(am)	(pm)	(am)	(pm)		
<b>Valores de área bajo la curva</b>									
Trolox	50 $\mu$ M	102,14 $\pm$ 0,13	101,79 $\pm$ 0,42	103,6 $\pm$ 0,57	102,45 $\pm$ 0,11	103,76 $\pm$ 0,73	103,64 $\pm$ 0,57	102,79	0,87
	25 $\mu$ M	90,97 $\pm$ 0,53	89,67 $\pm$ 0,63	91,67 $\pm$ 0,26	91,75 $\pm$ 0,46	90,65 $\pm$ 0,43	92,03 $\pm$ 0,29	91,12	0,88
	12,5 $\mu$ M	84,64 $\pm$ 0,71	84,08 $\pm$ 0,48	84,74 $\pm$ 0,46	84,73 $\pm$ 0,25	83,48 $\pm$ 0,46	85,13 $\pm$ 0,80	84,45	0,58
	6,25 $\mu$ M	80,9 $\pm$ 0,61	81,14 $\pm$ 0,53	82,06 $\pm$ 0,87	80,09 $\pm$ 0,79	80,25 $\pm$ 0,31	79,72 $\pm$ 0,57	80,69	0,85

**Tabla 1.** Áreas bajo la curva de cada concentración de trolox utilizada para cada experimentación. A partir de la tabla se obtuvo un promedio de cada concentración para conocer la curva de calibración final para el trolox.

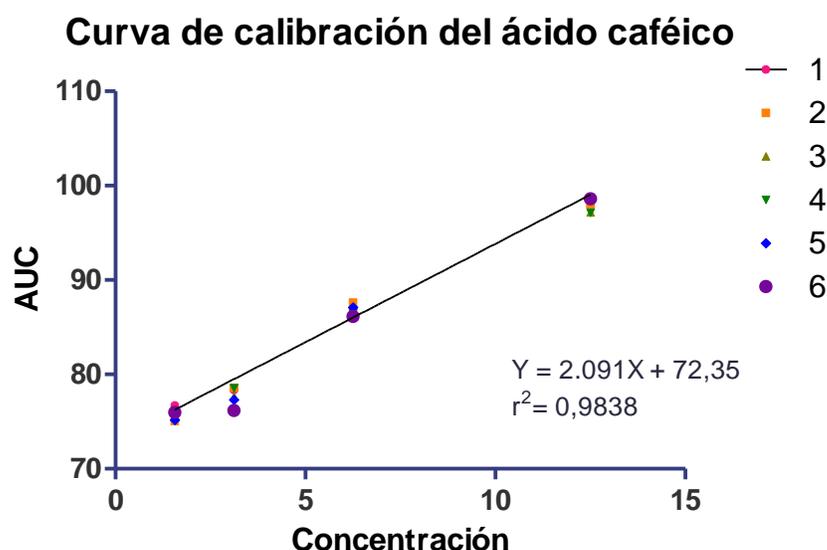


**Figura 9.** Curva de calibración del Trolox. Sextuplicado de datos obtenidos de la curva en 3 diferentes días de experimentación obtenidos de la tabla 1, cada curva por triplicada, evidenciando la baja dispersión de los datos.

El mismo procedimiento se realizó para los datos de ácido caféico, para lo cual se obtuvo una curva de calibración con la ecuación de la recta  $Y = 2,091X + 72,35$  y un coeficiente de determinación de 0,9838.

Muestra	Concentración	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	Día 3	Día 3	Promedio	S
		(am)	(pm)	(am)	(pm)	(am)	(pm)		
<b>Valores de área bajo la curva</b>									
Ácido caféico	12,50 $\mu$ M	98,82 $\pm$ 0,54	98,03 $\pm$ 0,82	97,17 $\pm$ 0,38	97,15 $\pm$ 0,43	98,54 $\pm$ 0,33	98,61 $\pm$ 0,20	98,05	0,73
	6,25 $\mu$ M	86,90 $\pm$ 0,57	87,61 $\pm$ 0,49	86,47 $\pm$ 0,12	86,51 $\pm$ 0,60	87,12 $\pm$ 0,09	86,17 $\pm$ 0,46	86,79	0,53
	3,12 $\mu$ M	78,36 $\pm$ 0,47	78,58 $\pm$ 0,62	77,67 $\pm$ 0,38	78,55 $\pm$ 0,38	77,32 $\pm$ 0,53	76,17 $\pm$ 0,68	77,77	0,91
	1,56 $\mu$ M	76,71 $\pm$ 0,85	75,06 $\pm$ 0,51	75,52 $\pm$ 0,87	76,15 $\pm$ 0,48	75,18 $\pm$ 0,24	74,97 $\pm$ 0,37	75,76	0,62

**Tabla 2.** Curvas de calibración para el ácido caféico en AUC.



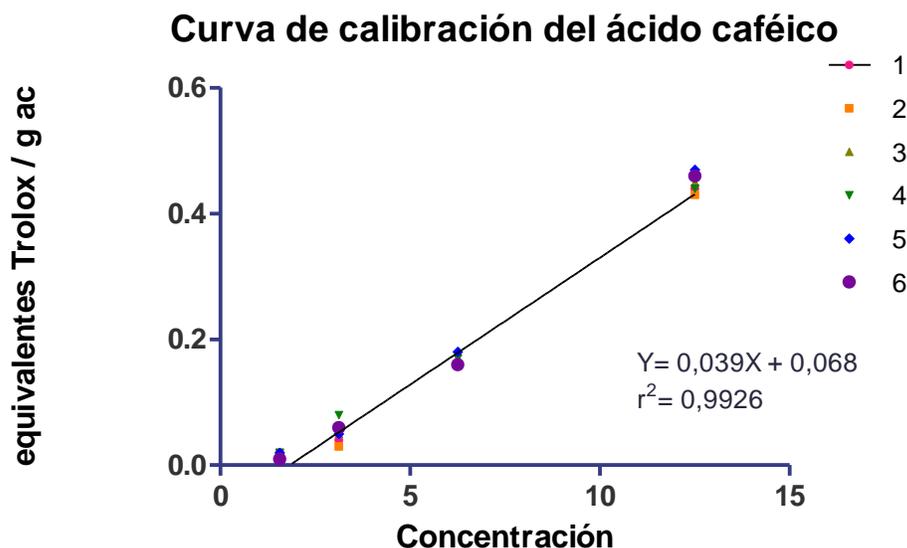
**Figura 10.** Curva de calibración del Ácido Caféico en AUC vs Concentración. Sextuplicado de datos obtenidos de la curva en 3 diferentes días de experimentación obtenidos de la tabla 2, cada curva por triplicada, evidenciando la baja dispersión de los datos.

Como se nombró antes, para el ácido caféico se calculó el área bajo la curva, sin embargo para conocer la capacidad antioxidante es necesario calcular los equivalentes trolox (ET), esto se realizó por medio de la ecuación 2 calculándolos para cada concentración con lo que se obtuvo la tabla 3 y a partir de ellos una

nueva curva cuya. Se puede evidenciar que las concentraciones del antioxidante influyen en los datos obtenidos, puesto que entre mayor concentración mayor capacidad antioxidante presenta el analito.

Muestra	Concentración	Día 1 (am)	Día 1 (pm)	Día 2 (am)	Día 2 (pm)	Día 3 (am)	Día 3 (pm)	Promedio	S
		Valores de equivalentes trolox por gramo de ácido caféico							
Ácido caféico	12,50 $\mu$ M	0,44 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,09	0,46 $\pm$ 0,06	0,44	0,08
	6,25 $\mu$ M	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	0,16	0,02
	3,12 $\mu$ M	0,04 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,01	0,05	0,02
	1,56 $\mu$ M	0,01 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,004	0,01 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,003	0,01 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,001	0,01	0,01

**Tabla 3.**Curvas de calibración para el ácido caféico en equivalentes troloxpor gramo de ácido caféico.



**Figura 11.**Curva de calibración para el ácido caféico en equivalentes trolox por gramo de ácido caféico vs concentración en micromolar de ácido caféico. Sextuplicado de datos obtenidos de la curva en 3 diferentes días de experimentación obtenidos de la tabla 3, cada curva por triplicada, evidenciando la baja dispersión de los datos.

En la literatura consultada se encontró que muchos autores como es el caso de Huang y colaboradores, realizan el cálculo de equivalentes trolox por medio de la fórmula 3 que se puede utilizar únicamente si se conoce la concentración exacta

de la muestra o el antioxidante utilizado es compuesto puro; por lo cual con el fin de obtener datos comparables a los del autor se realizaron los cálculos necesarios para obtener los equivalentes trolox por gramos de muestra.

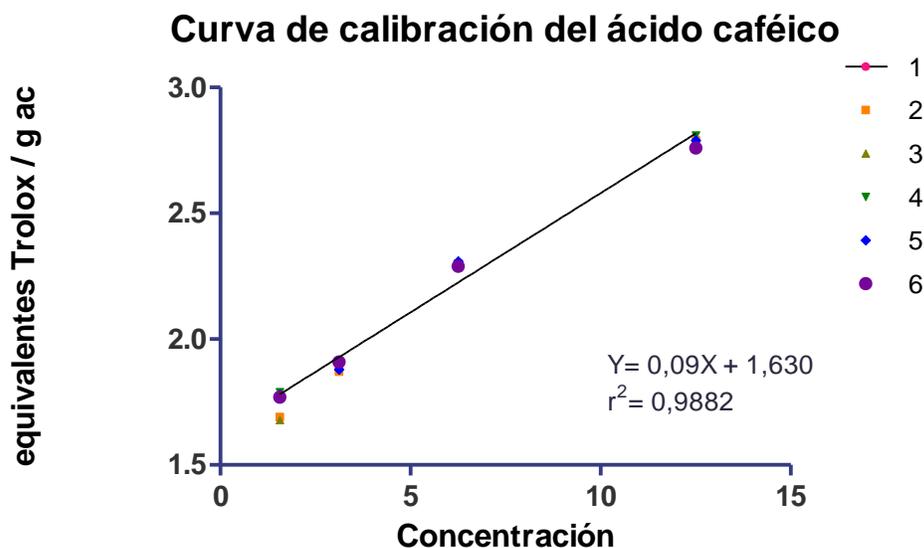
$$equivalentes\ Trolox = \left[ \frac{AUC_{muestra} - AUC_{blanco}}{AUC_{trolox} - AUC_{blanco}} \right] \frac{M_{trolox}}{M_{muestra}}$$

**Ecuación 3:** Equivalentes trolox. (Huang , Ou, Flanagan , Hampsch-Woodill, & Prior, 2002). Donde  $M_{trolox}$  y  $M_{muestra}$  son las molaridades del trolox que es 20  $\mu\text{M}$  y las de la muestra respectivamente.

Obteniendo:

Muestra	Concentración	Día 1 (am)	Día 1 (pm)	Día 2 (am)	Día 2 (pm)	Día 3 (am)	Día 3 (pm)	Promedio	S
		Valores de equivalentes trolox por gramo de ácido caféico							
Ácido caféico	12,50 $\mu\text{M}$	2,79 $\pm$ 0,06	2,79 $\pm$ 0,03	2,78 $\pm$ 0,04	2,81 $\pm$ 0,05	2,79 $\pm$ 0,02	2,76 $\pm$ 0,02	2,79	0,02
	6,25 $\mu\text{M}$	2,30 $\pm$ 0,07	2,30 $\pm$ 0,06	2,29 $\pm$ 0,08	2,30 $\pm$ 0,06	2,31 $\pm$ 0,05	2,29 $\pm$ 0,11	2,30	0,01
	3,12 $\mu\text{M}$	1,87 $\pm$ 0,34	2,14 $\pm$ 0,42	1,74 $\pm$ 0,39	1,90 $\pm$ 0,19	1,84 $\pm$ 0,12	1,93 $\pm$ 0,09	1,91	0,13
	1,56 $\mu\text{M}$	1,77 $\pm$ 0,19	1,69 $\pm$ 0,25	1,68 $\pm$ 0,21	1,79 $\pm$ 0,22	1,78 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,12	1,75	0,05

**Tabla 4.** Curva de calibración del ácido caféico en equivalentes trolox por gramo de ácido a partir de la ecuación 3.

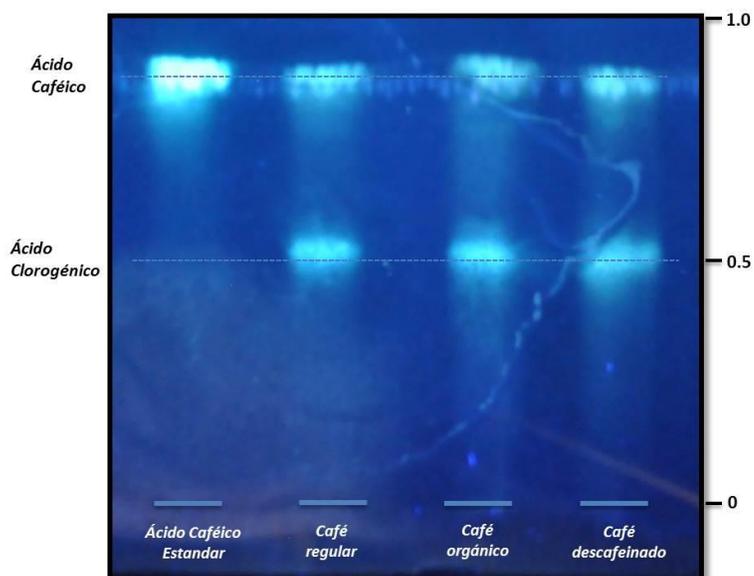


**Figura 12.** Sextuplicado de las curvas de calibración de ácido caféico obtenida a partir de la ecuación tres.

## 5.4 Muestras

Con el fin de obtener datos confiables y confirmar que el método fue validado, se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia relativa para tres tipos de café (café orgánico, café descafeinado y café regular).

Antes de realizar el procedimiento se confirmó la presencia del ácido caféico en las muestras por medio de una cromatografía planar, donde se observó la existencia de dos tipos de antioxidantes importantes, el ácido clorogénico y el ácido caféico. Estas moléculas que ya han sido descritas en *Coffea arabica* se convierten en moléculas de control químico para especificar la calidad del café y por esto fue necesario determinar su presencia. También es importante aclarar en cuanto al ácido clorogénico que a pesar de no poseer un estándar en el laboratorio, fue asignada su presencia por su valor de retención relativa y la propiedad de fluorescer como el ácido caféico.



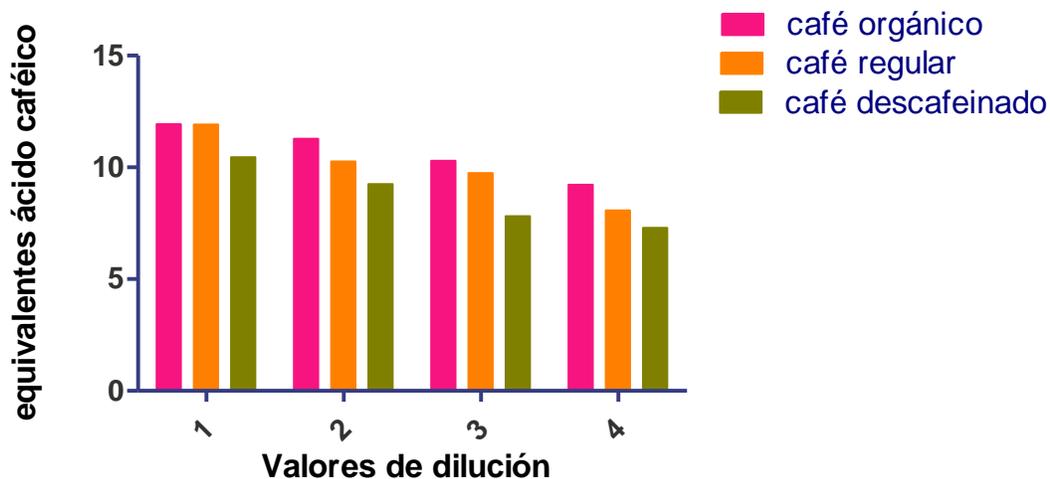
**Ilustración 1.** Cromatografía planar para ácido caféico y ácido clorogénico en los tres tipos de café.

Una vez hecha la comprobación de los principales marcadores quimiotaxonómicos se procedió a determinar los equivalentes trolox para cada tipo de muestra en determinadas concentraciones. A partir de las AUC obtenidas, se interpoló en la curva de calibración de ácido caféico con el fin de conocer la concentración de este en cada muestra ya que al ser analitos complejos, los equivalentes trolox obtenidos son totales. No obstante con estos datos se logró comparar entre los cafés su capacidad de resistencia a la oxidación.

Muestra	Diluciones	Equivalentes de ácido caféico	AUC	ET
Café regular	1/50	11,92	97,28	0,606
	1/100	10,26	93,81	0,245
	1/500	9,74	92,72	0,052
	1/1000	9,22	91,64	0,023
Café orgánico	1/50	11,94	97,32	0,607
	1/100	11,28	95,94	0,311
	1/500	10,30	93,89	0,052
	1/1000	8,08	89,25	0,020
Café descafeinado	1/50	10,45	94,21	0,528
	1/100	9,25	91,69	0,232
	1/500	7,82	88,71	0,039
	1/1000	7,30	87,62	0,018

**Tabla 5.** Equivalentes trolox de cada tipo de café en diferentes concentraciones. (ET: equivalentes trolox por gramo de café)

### Comparación de los diferentes tipos de café



**Figura 13.** Comparación de los equivalentes de ácido caféico por gramo de muestra de cada tipo de café. Donde uno es la disolución 1/50, dos es la disolución 1/100, tres es la disolución 1/500 y cuatro la disolución 1/1000.

## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Estandarización

El método ORAC se estandarizó en las instalaciones de la Universidad Icesicon la finalidad de tener una metodología definida para validar. Por medio de experimentación preliminar se determinaron los puntos críticos del método, se tomaron como variables la temperatura, la agitación y los rangos de emisión y excitación además de los volúmenes de cada reactivo en los pozos de la microplaca. Se evaluó cada variable obteniendo el punto óptimo para cada una, llevando esto a la estandarización de la metodología.

Al ser un método que utiliza reactivos de control especial, necesita que se definan los parámetros ideales para la manipulación no interfiera en los datos obtenidos. En el caso de la fluoresceína se definió tanto por revisión bibliográfica como por experimentación que necesita condiciones de oscuridad y baja temperatura para mantener sus propiedades fluorométricas, es por esto que se determinó que la vida útil de la solución madre es máximo de quince días, puesto que después de este tiempo la fluorescencia ha disminuido y los datos obtenidos pueden ser erróneos.

Este procedimiento se realizó para cada uno de los reactivos a pesar de que la cantidad utilizada durante la metodología es mínima, determinando que las soluciones madre se pueden refrigerar y almacenar por aproximadamente ocho días. Sin embargo en el caso de las muestras, depende de la naturaleza de la molécula que se tenga, en el caso del café solo se puede utilizar inmediatamente se prepare, puesto que al realizar las mediciones se evidenció variación en los datos ya que la muestra se sedimenta con el pasar de los días.

Como se dijo antes es complejo no perder fluorescencia durante la preparación y la lectura de la fluoresceína, es por esto que se desarrolló un método para medir la fluorescencia perdida por acción del tiempo, un blanco negativo (figura 5) donde se realiza la medición de la fluorescencia en ausencia de radical libre y antioxidante. En este caso las unidades relativas de fluorescencia tienen una variabilidad puesto que la fluorescencia no se comparte de igual manera en cada pozo. Las unidades relativas de fluorescencia obtenidas de blanco negativo se resta a las demás lecturas para eliminar el porcentaje de error que la pérdida de fluoresceína puede generar en la obtención de la capacidad antioxidante de la muestra. Para obtener datos reproducibles durante cada experimentación se realizan diez blancos negativos.

Otro blanco llevado a cabo es el positivo, en el cual incluye únicamente la cantidad adecuada de radical y fluoresceína, con el fin de observar la acción del radical

libre sobre la sonda fluorescente sin la acción de una molécula que impida la reducción. Este blanco se tiene en cuenta para las curvas de calibración como un cero, además se realizan diez lecturas por cada experimentación con la finalidad de conocer posteriormente los límites de cuantificación y determinación.

Para llevar a cabo la validación se realizaron curvas de calibración con concentraciones reportadas en la literatura para los dos estándares. Durante estas lecturas se obtuvieron datos de unidades relativas de fluorescencia que evidenciaron por medio de gráficos la influencia de la concentración de antioxidante sobre la oxidación de la sonda fluorescente, es por esto que a mayor concentración mayor es el tiempo que demora la sonda fluorescente en perder su fluorescencia.

Como se dijo durante los resultados la experimentación para realizar la validación se llevó a cabo seis veces durante tres días, evidenciando que las condiciones climáticas y la preparación de los reactivos no influye en los datos. Además al realizar las concentraciones por triplicado se evaluó la desviación de los datos y el porqué de su comportamiento.

Uno de los ejemplos para observar la dispersión de los datos es la figura 8, donde se evaluaron las réplicas de la concentración más pequeña utilizada para el tolox, evidenciando que a pesar de ser la más baja concentración, se puede evidenciar la cinética llevada a cabo y la baja dispersión de los datos. Este comportamiento se observó para cada concentración de trolox y de ácido caféico.

La experimentación se llevó a cabo por dos horas definida durante la estandarización puesto que es el tiempo que demora la oxidación total de la fluoresceína en el pozo con la concentración más alta de antioxidante estándar. A partir del lector de platos se obtienen unidades de fluorescencia, de los cuales se calculan las áreas bajo la curva de cada concentración evaluada por medio de la ecuación uno. Este proceso se realizó en un principio para el trolox para obtener la curva de calibración por cada experimentación (tabla 1) y observar si los datos tenían comportamiento lineal. Una vez verificado esto se evaluaron las áreas bajo la curva de las concentraciones de ácido caféico obteniendo la tabla 2.

Sin embargo para conocer el potencial antioxidante del ácido caféico es necesario calcular los equivalentes trolox. Durante la revisión bibliográfica se evidencio que existen dos fórmulas para realizar este cálculo, por lo cual se evaluaron los datos obtenidos a partir de cada ecuación (ecuación 2 y 3). Una vez obtenidos los datos se determinando que la ecuación que se utiliza para la obtención de los equivalentes trolox es la ecuación dos, puesto que tiene en cuenta la dilución de la muestra mientras en la ecuación tres únicamente se puede utilizar si se conoce su concentración y al ser un método para usar muestras de productos naturales y alimentos no siempre se conoce la concentración exacta que se está utilizando,

además los datos de la tabla 3 tienen menor desviación que los obtenidos por medio de la ecuación tres (tabla 4).

## 6.2 Validación de la metodología

Con estos datos se realizó la evaluación de la validación por medio de métodos estadísticos que permitieron comprobar la validez del procedimiento, esta valoración varía dependiendo del parámetro a evaluar (linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación).

Para la linealidad se usaron los datos registrados en la tabla 1, se graficó una curva de calibración evidenciando el comportamiento lineal de los datos (anexo 3), sin embargo se llevó a cabo una prueba estadística para demostrarlo, por medio de la determinación de los seis coeficientes de determinación que se encuentran en el anexo 2. A partir de estos datos se realizó una prueba t que permite comparar las medias de diferentes poblaciones basadas en los límites de confianza, permitiendo comprobar que tan lineales son las curvas de calibración obtenidas.

Para llevar a cabo la prueba t se determinó como hipótesis nula que si la  $t_{\text{tabla}}$  es menor o igual al t calculado no se encuentra correlación entre las variables y como hipótesis alterna si la  $t_{\text{tabla}}$  es mayor al t calculado teniendo en cuenta cinco grados de libertad y una confianza del 95% hay correlación entre X y Y, siendo X la concentración de trolox y Y el área bajo la curva. Cada  $t_r$  (anexo 5) se comparó con el criterio de aceptación (2,776) obteniendo que ninguno de los datos es menor o igual al de referencia por lo cual la linealidad de las curvas evaluadas son aceptadas pues existe correlación entre X y Y.

Al revisar la bibliográfica se observa que este parámetro se lleva a cabo por medio de una prueba de homogeneidad de varianzas en el artículo de Ou y colaboradores, el cual los coeficientes de determinación deben encontrarse entre  $0,99 \pm 1$  para declarar que el método es lineal. Con el fin de comparar los datos obtenidos experimentalmente y ver si cumplen con la linealidad por este método, se compara esta especificación con cada coeficiente de determinación experimental, obteniendo una vez más que el parámetro de linealidad se acepta.

Una vez evaluado este parámetro se determinaron los límites de cuantificación y detección con el fin de conocer hasta qué punto se obtienen datos confiables. Esto se llevó a cabo por medio de las áreas bajo la curva de los blancos positivos evaluados en cada experimentación, para esto se calculó el promedio de los datos obteniendo diez blancos negativos (anexo 10) con una desviación de datos de 0,58.

El cálculo del límite de detección se realizó por medio del anexo 7: ecuación 4, obteniendo 70,61 como el área bajo la curva mínima que puede ser detectada bajo condiciones confiables y reproducibles. Mientras el límite de cuantificación se calculó por medio del anexo 7: ecuación 5, donde 74,65 es el área bajo la curva mínima que puede ser cuantificada, es decir se pueden obtener los equivalentes trolox a partir de este punto, por lo cual diluciones en las que el área bajo la curva es menor no se puede cuantificar el potencial antioxidante de la muestra pero si se puede determinar el área bajo la curva para tenerla en cuenta en una curva de calibración.

Para realizar la evaluación estadística de la precisión se tuvo en cuenta las réplicas de cada concentración de trolox que se encuentran en los anexos 9, 11, 13 y 15. Se efectuó la evaluación de los datos obtenidos por concentración en cada una de las pruebas llevadas a cabo, con el fin de evaluar la homogeneidad de varianzas por medio de una prueba de Cochran. Para esto se determinó como hipótesis nula que el valor de la tabla debe de ser mayor al valor calculado para que haya precisión entre los datos. Para obtener el valor teórico se tuvo en cuenta dos grados de libertad puesto que cada concentración se realizó por triplicado y los seis veces la experimentación.

Una vez evaluados los datos (anexo 10, 12, 14 y 16) se obtienen el resultado experimental de la prueba que al compararlos con el criterio de aceptación, todos son mayores a este, por lo cual se puede decir que la precisión de la metodología es aceptada. Sin embargo con el fin de comparar los datos con parámetros registrados en la literatura, se revisó la bibliografía donde la FDA tiene como parámetro de aceptación para la precisión en el cual el coeficiente de variación por cada concentración evaluada debe ser menor o igual al 15% del límite de cuantificación. Al comparar este parámetro con los datos obtenidos, se cumple la especificación por lo cual una vez más se evidencia que el método es preciso. Hay que tener en cuenta que existe una variabilidad de los datos puesto que el control de la fluorescencia es complejo, además de la variabilidad de volúmenes incrementa la desviación por mínima que sea.

Para este parámetro se evaluó también la repetitividad y reproducibilidad de los datos, para lo cual se acepta la hipótesis nula si el resultado es menor o igual a dos, calculado por medio de una prueba de homogeneidad de varianzas. A pesar de lo que se habló antes, la variación de los datos no es significativa por lo cual se acepta la hipótesis, es decir el método es reproducible y posee repetitividad.

Con la finalidad de comparar la evaluación estadística con la encontrada en la bibliografía, se compararon las especificaciones utilizadas por Ou y colaboradores para la precisión, donde plantean que la desviación máxima que pueden tener las réplicas es de 15%. A partir del parámetro anterior y con los datos de las tablas se puede decir que el parámetro de validación es aceptado.

Para la exactitud se evaluaron los seis datos experimentales de las áreas bajo la curva del ácido caféico y como datos teóricos se tomó los datos obtenidos a partir de la interpolación de las concentraciones usadas para el ácido caféico en la curva de calibración del trolox (anexo 17).

Estadísticamente se llevó a cabo una prueba de homogeneidad de varianzas, donde la hipótesis nula se definió como si no se encuentra diferencia significativa entre las varianzas de grupo se acepta la hipótesis, mientras la hipótesis alterna se acepta si se encuentra diferencia significativa entre los datos. Para esto se tuvo en cuenta que la aceptación de la hipótesis nula se lleva a cabo si el valor teórico obtenido a partir de la tabla de la prueba de Cochran es mayor al dato calculado de la prueba.

Para llevar a cabo esto se calculó las varianzas por grupo para obtener el dato experimental de la prueba de Cochran, a partir de eso se aceptó la hipótesis nula, por lo cual no se encontró diferencia significativa a entre los datos experimentales y los teóricos, por lo cual el método es exacto.

También se realizó el cálculo adecuado para conocer la recuperación media del método obteniendo 104,5% de recuperación, valor que se encuentra dentro del rango del criterio de aceptación, significa que el método tiene la exactitud necesaria para considerarlo adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante.

El parámetro de selectividad no se llevó a cabo puesto que el método no lo es, el proceso se encarga de determinar la capacidad antioxidante de los productos como una sola unidad, pero no tiene la capacidad de determinar la capacidad que tiene un antioxidante específico dentro de la muestra.

A pesar de no cumplir con uno de los parámetros de validación, se puede concluir que el método fue validado puesto que se comprobó estadísticamente que es preciso, exacto, lineal y tiene un límite de detección y de cuantificación identificados.

### **6.3 Muestras**

Para corroborar que el método se validó se llevó a cabo la medición de tres muestras de café con el fin de evidenciar su capacidad antioxidante, comparar está entre cada café y demostrar que a partir del método se tienen datos confiables y reproducibles.

A partir de las diluciones realizadas a las muestras se obtuvo los equivalentes trolox permitiendo la comparación de la capacidad de resistencia a la oxidación que posee cada uno.

En la figura 13 se puede observar las diferentes concentraciones de equivalentes de ácido caféico en cada tipo de café. En el caso del café orgánico, es el que mayor cantidad de antioxidante presenta, siendo el que posee mayor número de equivalentes de ácido caféico con respecto a las otras dos muestras, esto posiblemente debido a que es el café que menos procesos ha pasado para ser consumido. Sin embargo el café regular no tiene mayor cambio entre los equivalentes de ácido caféico en comparación con el orgánico, pero en el café descafeinado es notorio que pierde gran cantidad de antioxidantes mediante el método de descafeinización, tal vez debido a que el proceso se realiza por medio de fluidos supercríticos en el cual no solo se extrae la cafeína también puede perder compuestos importantes como los antioxidantes que se evidencian en este caso.

Los datos obtenidos fueron comparados con alimentos evaluados por el departamento de agricultura de los Estados Unidos, los cuales han predeterminado por medio del método ORAC valores de la capacidad antioxidante para gran variedad de productos naturales. Al ser comparados con productos como el té negro que tiene una capacidad antioxidante mínima de 170 equivalentes trolox por 100 gramos de muestra (Haytowitz & Bhagwat, 2010) frente a los de 60 equivalentes trolox por 100 gramos de muestra obtenidos a partir de la concentración más alta evaluada para el café orgánico y el café regular, el té negro tiene una capacidad antioxidante cien veces mayor por cada 100 gramos de muestra que la que poseen los cafés evaluados en el laboratorio. Esto se debe a la gran variedad de compuestos antioxidantes como las catequinas los cuales son reconocidos y potentes antioxidantes.

Con esta experimentación y todos los resultados obtenidos se establece que el método ORAC ha sido validado y se comprueba que los resultados obtenidos son confiables. Es evidente que la Universidad puede seguir haciendo uso de este método que es frecuentemente solicitado por empresas que desean darle valores adicionales a sus productos y para posicionarlos en los mercados internacionales aprovechando la apertura comercial que hoy por hoy sufre nuestro país.

## 7 CONCLUSIONES

Se adaptaron condiciones de temperatura, concentración y volumen de reactivos, tiempo de lectura y ecuaciones utilizadas para conocer el poder antioxidante de las muestras permitiendo la estandarización del método ORAC en las instalaciones de la Universidad ICESI.

Después de haber llevado a cabo la metodología ORAC en las instalaciones de la Universidad Icesi, por medio del lector de platos se obtuvieron datos que evaluados estadísticamente comprueban que el método para medir la capacidad antioxidante en alimentos y productos naturales es lineal, preciso, exacto y con un límite de detección y cuantificación definidos siempre que se trabaje bajo las condiciones establecidas, permitiendo llevar a cabo mediciones para conocer y comparar la capacidad de alimentos y productos naturales.

## 8 RECOMENDACIONES

Se recomienda para el analista que va a llevar a cabo el método tener un buen manejo de la micropipeta, ya que el hecho de no tomar el volumen correcto puede llevar a cambios significativos en los datos obtenidos. Por medio del uso de la micropipeta multicanal es mucho más eficiente y preciso la obtención de los volúmenes, ya que al ser tan pequeños una modificación pueden llevar a datos erróneos.

Es necesario tener especial cuidado con la manipulación de las soluciones de fluoresceína, pues solo el contacto directo con la luz genera pérdida de fluorescencia, es por esto que se recomienda mantener las soluciones a bajas temperaturas y cubiertas.

También se recomienda estar pendiente de la temperatura del equipo, pues si esta cambia, varían las condiciones a las cuales se estandarizó el método. El hecho de que la temperatura del equipo varíe lleva a que la interacción entre la fluoresceína y el antioxidante no sea la adecuada, además que para generar la formación del radical a partir del AAPH es necesaria la exposición a esta temperatura.

Hay que tener en cuenta que para evaluar muestras estas deben de ser de carácter lipofílico puesto que toda la metodología se realiza a base de buffer fosfato. Además se deben de realizar procesos para que la homogeneidad de las muestras sea la adecuada.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, L., García, J., García, T., Illera, M., Juncadella, M., Lizondo, M., y otros. (2001). Validación de métodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En *Validación de métodos analíticos* (págs. 39-133). España: AEFI.

Bisby, R., Brooke, R., & Navaratnam, S. (2007). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Elsevier*.

Brescia, P. (8 de junio de 2012). *BioTek*. Recuperado el 5 de abril de 2014, de Determination of Antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay with Synergy H4: <http://www.biotek.com/resources/articles/antioxidant-potential-using-orac.html>

Gülcin, İ. (Septiembre de 2005). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *El Sevier Ireland*.

Gutiérrez, Y. I., Martínez, M. M., Varona, N., & Rodríguez, A. T. (2000). Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajaba*, L. *Revista Cubana Farm*.

Haytowitz, D. B., & Bhagwat, S. (2010). *USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, release 2*. Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center (BHNRC), Agricultural Research Service (ARS) and U.S. Department of Agriculture (USDA).

Held, P. (15 de Agosto de 2005). *BioTek*. Recuperado el 4 de Abril de 2014, de Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity Assays with Synergy HT: [http://www.biotek.com/resources/docs/ORAC\\_Assay\\_Application\\_Note.pdf](http://www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf)

Huang, D., Ou, M., Flanagan, J., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System. *Journal of agricultural and food chemistry*.

Hyogo, A., Kobayashi, T., Garcia del Saz, E., & Seguchi, H. (2010). Antioxidant effects of protocatechuic acid, ferulic acid and caffeic acid in human neutrophils using a fluorescent substance. *Int. J. Morphol.*

ICH. (2014). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. San Diego.

ISO 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. (2005). *ICONTEC*.

Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Caldas: Corporativa Universidad Lasallista.

Muñoz, A. M., Ramos, F., Ortiz, C., & Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.*

Soto, L. D. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*.

USP 37, NF 32, Capítulo 1223, Validation of Compendial Methods

Velasquez, C. (2000). Papel de las especies reactivas del oxígeno en la arterioesclerosis. *Universidad de Antioquia*.

Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*.

Vidal, A., Motidome, M., Marcini-Filho, J., Fallerero, A., Midori, M., Brandao, L. M., y otros. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Brythmion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas*.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Elsevier*.

## 10 ANEXOS

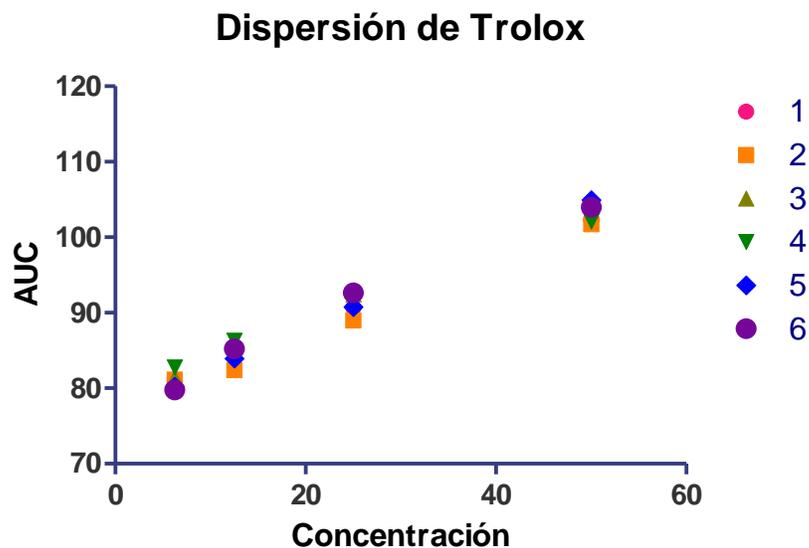
**Anexo 1:** Composición de cada poso en la microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6,25 µm Trolox	12,5 µm Trolox	20 µm Trolox	25 µm Trolox	50 µm Trolox							
B	6,25 µm Trolox	12,5 µm Trolox	20 µm Trolox	25 µm Trolox	50 µm Trolox							
C	6,25 µm Trolox	12,5 µm Trolox	20 µm Trolox	25 µm Trolox	50 µm Trolox							
D	1,56 µm A. Cafeico	3,12 µm A. Cafeico	6,25 µm A. Cafeico	12,50 µm A. Cafeico								
E	1,56 µm A. Cafeico	3,12 µm A. Cafeico	6,25 µm A. Cafeico	12,50 µm A. Cafeico								
F	1,56 µm A. Cafeico	3,12 µm A. Cafeico	6,25 µm A. Cafeico	12,50 µm A. Cafeico								
G	Blanco positivo	Blanco positivo	Blanco positivo	Blanco positivo	Blanco positivo	Blanco positivo	Blanco positivo	Blanco positivo				
H	Blanco negativo	Blanco negativo	Blanco negativo	Blanco negativo	Blanco negativo	Blanco negativo	Blanco negativo	Blanco negativo				

**Anexo 2.** Coeficiente de determinación para las curvas de calibración del trolox por experimentación para evaluar el parámetro de linealidad

	Día 1 (am)	Día 1 (pm)	Día 2 (am)	Día 2 (pm)	Día 3 (am)	Día 3 (pm)
$r^2$	0,9974	0,9934	0,9976	0,9971	0,9997	0,9852
r	0,9987	0,9967	0,9988	0,9985	0,9996	0,9925

**Anexo 3.** Dispersión de las curvas de calibración obtenidas a partir de las seis experimentaciones realizadas



**Anexo 4.** Ecuación para el cálculo de la t experimental para realizar la prueba estadística t.

$$t_r = \frac{r(n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}}$$

**Anexo 5.** T experimental calculada a partir de los coeficientes de determinación de las curvas de calibración para evaluar el parámetro de linealidad.

	Día 1 (am)	Día 1 (pm)	Día 2 (am)	Día 2 (pm)	Día 3 (am)	Día 3 (pm)	Criterio de aceptación
$t_r$	28,11	17,43	29,25	26,59	156,74	11,54	> 2,776

**Anexo 6.** Datos de área bajo la curva de los diez blancos positivos para evaluar los límites de detección y cuantificación de la metodología.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	S	Promedio
<b>blancos positivos</b>	68,80	68,87	69,25	68,43	68,18	69,39	69,31	69,84	68,02	68,67	0,58	68,88

**Anexo 7.** Ecuaciones para calcular los límites de detección y cuantificación.

$$\text{Limite de detección} = \bar{Y}_{10} + 3S_{10}$$

**Ecuación 4.** Límite de detección.

$$\text{Limite de cuantificación} = \bar{Y}_{10} + 10S_{10}$$

**Ecuación 5.** Límite de cuantificación.

**Anexo 8.** Límite de detección y límite de cuantificación.

<b>Límite de detección</b>	70,61
<b>Límite de cuantificación</b>	74,65

**Anexo 9.** Datos de las replicas por experimentación de la concentración 50 µM de trolox.

	Concentración 50 µM de trolox					
replica	Día 1 am	Día 1 pm	Día 2 am	Día 2 pm	Día 3 am	Día 3 pm
1	102,29	101,50	103,91	102,32	104,57	103,98
2	102,08	101,23	103,95	102,53	103,14	102,98
3	102,05	100,66	102,94	102,51	103,57	103,97
<b>Promedio</b>	102,137	101,129	103,603	102,119	103,758	103,639
<b>Varianza</b>	0,018	0,185	0,327	2,688	0,535	0,330
<b>Cv</b>	0,001	0,004	0,006	0,012	0,007	0,006

**Anexo 10.** Datos de la prueba de Cochran, repetitividad y reproducibilidad calculados a partir del anexo 6, evaluando la precisión.

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>Prueba Cochran</b>	0,435	<0,6161
<b>Repetitividad</b>	0,648	=< 2
<b>Reproducibilidad</b>	1,379	=< 2

**Anexo 11.** Datos de las replicas por experimentación de la concentración 25µM de trolox

replica	Concentración 25 µM de trolox					
	Día 1 am	Día 1 pm	Día 2 am	Día 2 pm	Día 3 am	Día 3 pm
1	90,96	88,94	91,97	91,51	90,25	92,25
2	91,50	90,04	92,45	92,28	91,12	91,69
3	90,44	90,03	92,61	91,45	90,59	92,15
<b>Promedio</b>	90,97	89,67	92,34	91,75	90,65	92,03
<b>Varianza</b>	0,28	0,40	0,11	0,21	0,19	0,09
<b>Cv</b>	0,006	0,007	0,004	0,005	0,005	0,003

**Anexo 12.** Datos de la prueba de Cochran, repetitividad y reproducibilidad calculados a partir del anexo 8, evaluando la precisión.

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>Prueba Cochran</b>	0,319	0,6161
<b>Repetitividad</b>	0,711	=< 2
<b>Reproducibilidad</b>	1,662	=< 2

**Anexo 13.** Datos de las replicas por experimentación de la concentración 12.5µM de trolox

replica	Concentración 12,5 µM de trolox					
	Día 1 am	Día 1 pm	Día 2 am	Día 2 pm	Día 3 am	Día 3 pm
1	84,29	83,65	84,34	84,39	82,95	85,89
2	85,45	84,60	84,62	84,60	83,80	84,28
3	84,17	83,99	85,25	86,00	83,69	85,21
<b>Promedio</b>	84,64	84,08	84,74	85,00	83,48	85,13
<b>Varianza</b>	0,50	0,23	0,21	0,76	0,21	0,66
<b>Cv</b>	0,008	0,006	0,005	0,010	0,005	0,009

**Anexo 14.**Datos de la prueba de Cochran, repetitividad y reproducibilidad calculados a partir del anexo 10, evaluando la precisión.

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>Prueba Cochran</b>	0,347	0,6161
<b>Repetitividad</b>	0,937	=< 2
<b>Reproducibilidad</b>	1,372	=< 2

**Anexo 6.**Datos de las replicas por experimentación de la concentración 6.25µM de trolox

	Concentración 6,25 µM de trolox					
replica	Día 1 am	Día 1 pm	Día 2 am	Día 2 pm	Día 3 am	Día 3 pm
1	80,47	81,61	82,04	80,88	80,60	80,35
2	81,60	80,56	82,94	79,30	79,98	79,24
3	80,64	81,25	81,19	80,08	80,18	79,57
<b>Promedio</b>	80,90	81,14	82,06	80,09	80,25	79,72
<b>Varianza</b>	0,38	0,29	0,77	0,63	0,10	0,33
<b>Cv</b>	0,007	0,007	0,011	0,009	0,004	0,007

**Anexo 16.**Datos de la prueba de Cochran, repetitividad y reproducibilidad calculados a partir del anexo 12, evaluando la precisión.

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>Prueba Cochran</b>	0,310	0,6161
<b>Repetitividad</b>	1,118	=< 2
<b>Reproducibilidad</b>	1,930	=< 2

**Anexo 77.**Datos experimentales y datos teóricos del ácido caféico para el parámetro de exactitud

concentración	AUC teórico	AUC experimental	Varianza de grupo
12,50	84,16	98,01	4,166E-01
12,50	84,16	98,10	
12,50	84,16	97,08	
12,50	84,16	97,64	
12,50	84,16	98,48	
12,50	84,16	97,22	
6,25	80,90	86,99	2,849E-01
6,25	80,90	86,59	
6,25	80,90	86,69	
6,25	80,90	86,67	
6,25	80,90	87,57	
6,25	80,90	86,31	
3,12	79,26	78,20	8,500E-01
3,12	79,26	77,35	
3,12	79,26	76,70	
3,12	79,26	78,14	
3,12	79,26	78,66	
3,12	79,26	78,35	
1,56	78,45	75,76	9,257E-02
1,56	78,45	75,77	
1,56	78,45	75,69	
1,56	78,45	75,68	
1,56	78,45	76,25	
1,56	78,45	75,56	

**Anexo 18.** Dato experimental de la prueba de Cochran para evaluar la exactitud

	Resultado	Criterio de aceptación
<b>Prueba de Cochran</b>	0,517	0,5985
<b>Recuperación media</b>	104,5	$99 < r < 105$

**Anexo 8:** Protocolo para llevar a cabo la metodología.

## **Realización del método ORAC.**

### **Objetivos**

1. Conocer lamétodo ORAC validado en el laboratorio de la Universidad Icesi.
2. Medir la capacidad antioxidante de productos naturales.

### **Introducción**

Uno de los métodos más usado para conocer la capacidad antioxidante de productos naturales, es el método ORAC. Por medio de esta metodología se puede obtener la capacidad que tiene un antioxidante para impedir la oxidación de una sonda fluorescente en el tiempo, obteniendo los equivalentes Trolox, datos mundialmente usados.

El método consiste en exponer una sonda fluorescente como la fluoresceína a radicales libres, los cuales por medio de oxidación disminuyen la fluorescencia de la misma. La adición de un antioxidante en el método permite inhibir el daño oxidativo, haciendo que la luminiscencia se mantenga por mucho más tiempo ya esta especie química dona un hidrogeno al radical libre peroxilo producido a partir del AAPH. La donación de estos átomos permite medir la capacidad antioxidante, entre más antioxidante sea más tiempo de fluorescencia se obtiene.

### **PALABRAS CLAVES**

**Antioxidante:** es una especie química capaz de retardar la oxidación de otra molécula, en el caso de la metodología impide que se dé el daño oxidativo a la fluoresceína.

**Trolox:** es un análogo de la vitamina E y un potente antioxidante, es muy usado como estándar en diferentes metodología para realizar curvas de calibración de referencia.

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropano)-dihidrocloruro, a partir de este compuesto da la generación de radicales libres que van a atacar a la sonda fluorescente. El radical libre que genera en presencia de oxígeno y temperatura a 37°C es el radical peroxilo.

## Procedimiento

### 1. Materiales

Material	Cantidad
Matraz 5 mL	11
Matraz 25 mL	1
Matraz 100 mL	2
Matraz 200 mL	1
Sonicador	1
Espectofotómetro	1
microplaca	1
Micropipeta multicanal	1
Micropipeta 200 uL oscura	1

### 2. Reactivos

Reactivo	Cantidad
Trolox	3 mg
Ácido Caféico	20 mg
AAPH	300 mg
Fluoresceína	50 mg

Fosfato de Potasio monobasico	800 mg
Difosfato de Potasio	2000 mg

### 3. Procedimiento experimental

#### 3.1 Preparación de reactivos

1. Pesar 0,788 g de Fosfato de Potasio monobásico en un beaker
2. Pesar 1,602 g de Difosfato de Potasio en el mismo beaker anterior.
3. Diluir con agua destilada y pasar al matraz de 200 mL, teniendo precaución de no dejar residuos. Llevar a volumen con agua destilada. Rotular como solución buffer a pH 7
4. Pesar en un beaker 44 mg de Fluoresceína y diluir con solución Buffer.
5. Pasar el matraz de 100 mL y llevar a volumen con solución buffer. Rotular como solución madre de Fluoresceína, proteger de la luz y mantener a bajas temperaturas (este stock puede durar varias semanas si se deja a temperaturas bajas).
6. A partir de la solución madre de Fluoresceína tomar 126 uL, llevarlos al matraz de 25 mL y llevar a volumen con solución buffer. Rotular como solución 2 de Fluoresceína.
7. Pesar en un beaker 0,299 g de AAPH y diluir con solución buffer. Llevar al matraz de 5 mL y enrasar.
8. Pesar 2,46 g de Trolox en un beaker y diluir con solución buffer. Pasar un matraz de 5 mL y llevar a volumen. Rotular como solución madre de Trolox.
9. A partir de la solución madre de Trolox tomar 125, 62.5, 31 y 15,6 uL llevar cada uno a un matraz de 5 mL y enrasar con solución buffer. Con esto se obtienen concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25 uM respectivamente, rotular.
10. Pesar 18 mg de Ácido Caféico en un beaker y llevar a un matraz de 100 mL, antes de completar a volumen llevar al sonicador por 5 mL, enrasar con solución buffer. Rotular como solución madre de Ácido

Caféico (si se mantiene a bajas temperaturas puede durar por una semana).

11. A partir de la solución madre de Ácido Caféico tomar 62.5, 31.2, 15.6 y 7.8 uL, llevar cada uno a un matraz de 5 mL y completar a volumen con solución buffer. Rotular cada matraz con 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 uM respectivamente.
12. Para realizar la preparación de las muestras es necesario conocer que tan soluble es en agua, si necesita más tiempo en el sonicador para su dilución y/o es necesario realizar filtración. Es necesario tener en cuenta que dependiendo de la naturaleza de la muestra es necesario realizar diluciones.

### 3.2 Preparación de la microplaca y equipo.

1. Identificar cada pozo con las diferentes diluciones de Trolox, ácido Caféico, muestra, blanco positivo y blanco negativo.
2. Tomar con la micropipeta multicanal 75 uL de Fluoresceína 2 y llevarlo a todos los pozos.
3. Tomar 75 uL de la dilución de Trolox y llevarla al pozo identificado con la concentración. Repetir el proceso con cada concentración de Trolox.
4. Tomar 75uL de la dilución de Ácido Caféico y llevarla al pozo identificado con la concentración. Repetir el proceso con cada concentración de ácido.
5. Tomar 75 uL de la dilución de la muestra y llevarla al pozo identificado con la concentración. Repetir el proceso con cada concentración de la muestra.
6. Tomar 75 uL de solución buffer y llevarla al pozo identificado como blanco positivo.
7. Tomar 125 uL de solución buffer y llevarla al pozo identificado como blanco negativo.
8. Prepara el equipo para llevar a cabo el procedimiento, con una emisión de 520 nm y una excitación 485nm.
9. Llevar el equipo a 37°C.
10. Introducir la microplaca al plato del equipo.

11. Incubar la microplaca por 30 minutos.
12. Adicionar 50 uL de AAPH a cada pozo, con excepción de los identificados como blancos negativos.
13. Realizar mediciones cada 3 minutos por dos horas.
14. Obtener los datos.

### 3.3 Evaluación de los datos.

1. Calcular el área bajo la curva de cada muestra con la ecuación 1.

$$AUC = (0,5 + \sum \frac{f_n}{f_1}) \times 5$$

**Ecuación 4:** Obtención del área bajo la curva a partir de los datos de fluorescencia relativa (Huang , Ou, Flanagan , Hampsch-Woodill, & Prior, 2002)

2. Restar a cada dato el AUC del blanco negativo.
3. Calcular los equivalentes Trolox para las muestras.

$$equivalentes\ Trolox = \frac{C_{Trolox} (AUC_{muestra} - AUC_{blanco})k}{(AUC_{Trolox} - AUC_{blanco})}$$

**Ecuación 5:** Obtención de equivalentes Trolox (Huang , Ou, Flanagan , Hampsch-Woodill, & Prior, 2002)

4. Graficar las curvas de calibración de cada estándar.
5. Interpoliar los datos de las muestras en la curva de calibración, obteniendo la concentración del antioxidante en la muestra.

## 4. Bibliografía

Aguirre, L., García , J., García , T., Illera , M., Juncadella, M., Lizondo, M., y otros. (2001). Validación de metodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas . En *Validación de metodos analíticos* (págs. 39-133). España: AEFI.

Bisby , R., Brooke, R., & Navaratnam, S. (2007). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Elsevier*.

Brescia, P. (8 de junio de 2012). *BioTek* . Recuperado el 5 de abril de 2014, de Determination of Antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance

Capacity (ORAC) assay with Synergy H4:  
<http://www.biotek.com/resources/articles/antioxidant-potential-using-orac.html>

- Gülcin , Í. (Septiembre de 2005). Antioxidant activity of caffeic acid ( 3,4-dihydroxycinnamic acid). *El Sevier Ireland*.
- Gutiérrez, Y. I., Martínez, M. M., Varona , N., & Rodríguez , A. T. (2000). Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y flavonoides (Quercetina ) en Psidium guajaba, L. . *Revista Cubana Farm*.
- Held, P. (15 de Agosto de 2005). *BioTek*. Recuperado el 4 de Abril de 2014, de Performing Oxygen Radical Absorbance Capacity Assays with Synergy HT:  
[http://www.biotek.com/resources/docs/ORAC\\_Assay\\_Application\\_Note.pdf](http://www.biotek.com/resources/docs/ORAC_Assay_Application_Note.pdf)
- Huang , D., Ou, M., Flanagan , J., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- Hyogo, A., Kobayashi, T., Garcia del Saz, E., & Seguchi, H. (2010). Antioxidant effects of protocatechuic acid, ferulic acid and caffeic acid in human neutrophils using a fluorescent substance. *Int. J. Morphol*.
- ICH. (2014). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. San Diego .
- ISO 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración . (2005). *ICONTEC*.
- Muñoz, A. M., Ramos , F., Ortiz, C., & Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenolicos en recursos vegetales promisoros . *Revista de la Sociedad Quimica del Perú* .
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem*.
- Soto , L. D. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cuba medicina militar* .
- Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes . *Revista Cubana Medicina Militar* .

Vidal, A., Motidome, M., Marcini-Filho, J., Fallerero, A., Midori, M., Brandao, L. M., y otros. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Brythmion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas* .

Zulueta , A., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products . *Elsevier* .