



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA
ENERGÍA Y MECÁNICA

CARRERA DE INGENIERÍA PETROQUÍMICA



Comparación simultánea de la respuesta analítica a la actividad antioxidante frente a diferentes métodos de análisis: DPPH, ABTS, PCL, Folin-Ciocalteu.

Autor: Mauricio Bedón Ipial

Director: Roman Rodríguez Maecker



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

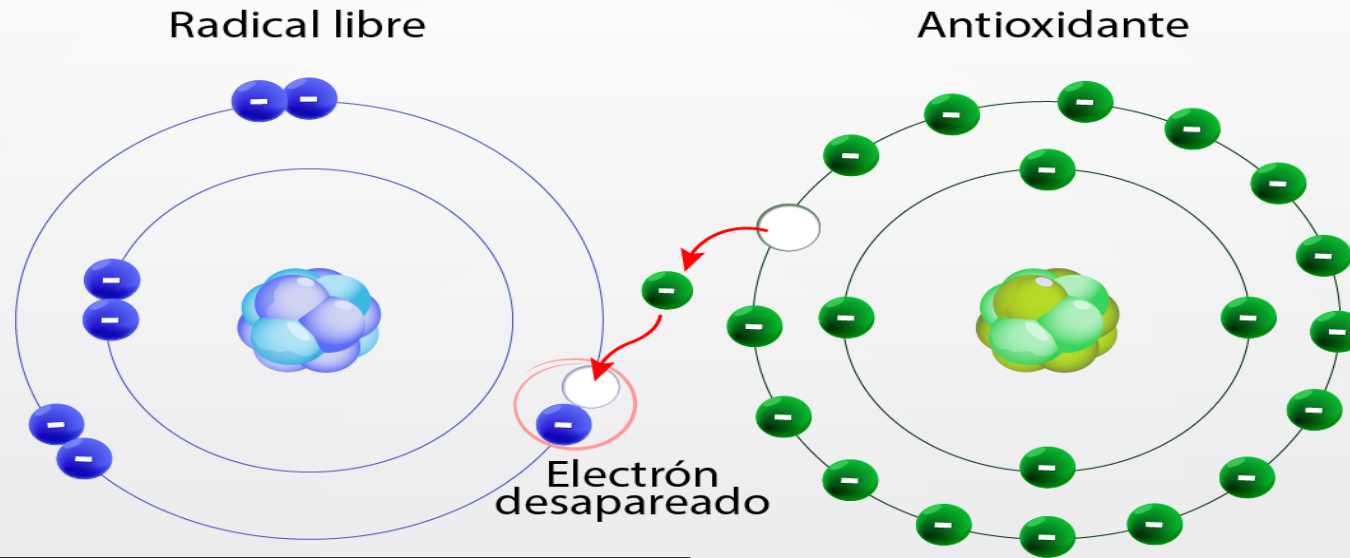
JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

OBJETIVOS

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

RESULTADOS

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



Radicales	Especies Reactivas (RNS/ROS)
Hidroxilo (HO•)	Peróxidos Orgánicos (ROOH)
Peroxilo (ROO•)	Ácido nitroso (HNO ₂)
Hidroperoxilo (HOO•)	Catión Nitrilo (NO ₂ ⁺)
Superóxido (O ₂ • ⁻)	Oxígeno (O ₂)
Óxido Nítrico (NO•)	Alquilperoxinitrilos (ROONO)
Alcoxilo (RO•)	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
Dióxido de Nitrógeno (NO ₂ •)	Ozono (O ₃)

ANTIOXIDANTES

VITAMINA C

TOCOFEROLES

CAROTENOIDES

FLAVONOIDES

CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Nombre de los ensayos	Abreviaciones
Ensayo de capacidad de absorbanza de radical de oxígeno.	ORAC
Ensayo de parámetro de captura de radicales libres.	TRAP
Ensayo de capacidad de barrido de oxoradicales totales.	TOSC
Ensayo de poder antioxidante ferro reductor.	FRAP
Ensayo de capacidad antioxidante reductora de cobre.	CUPRAC
Ensayo de capacidad antioxidante reductora de Ce (IV).	CERAC
Ensayo de capacidad antioxidante reductor de Cr (VI).	CHROMAC
Ensayo basado en voltametría cíclica.	CV
Ensayo basado en pulso diferencial.	DPV
Ensayo basado en voltametría de onda cuadrada.	SWV
Ensayo basado en electrodo de mercurio.	DME
Ensayo basado en nanopartículas de plata.	SNPAC
Ensayo basado en nanopartículas de oro.	Au NPs
Ensayo de capacidad antioxidante en equivalente de Trolox empleando radical ABTS.	ABTS
Ensayo de capacidad de barrido de radicales empleando el radical DPPH.	DPPH
Ensayo de capacidad de reducción de metales con reactivo de Folin Ciocalteu	F-C
Ensayo basado en quimioluminiscencia de luminol.	PCL

Expresión de resultados

TEAC: mol Trolox/ gr de sustancia.

α TEAC: mol α Tocoferol/ gr de sustancia.

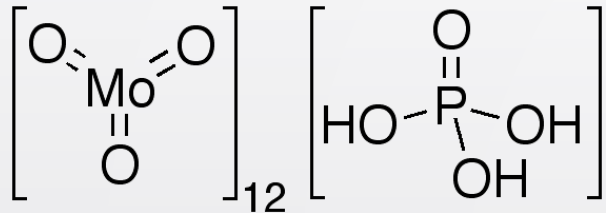
AAE: ug Áscórbico/ gr de sustancia.

AGE: mol Á.Gálico/ gr de sustancia.

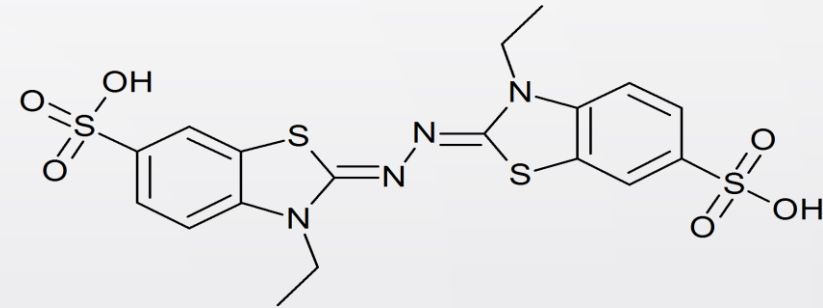
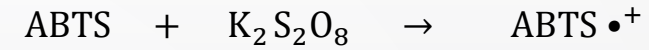
PRINCIPIO DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

Folin - Ciocalteu

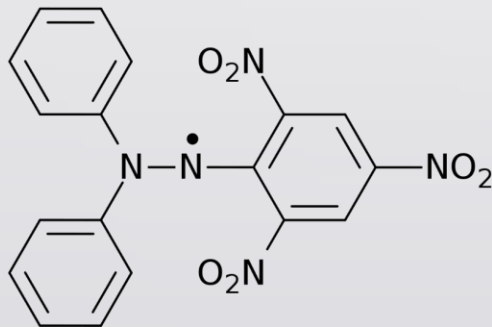
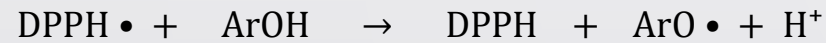
$Mo(VI)$ (amarillo) + e^- (obtenido del AO) \rightarrow $Mo(V)$ (azul)



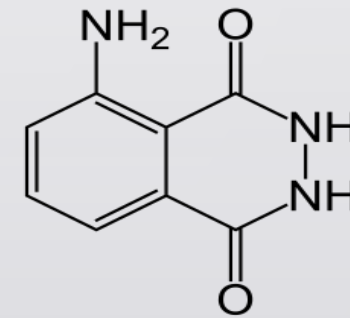
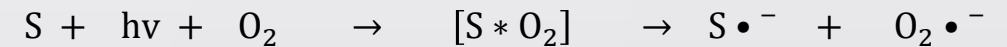
ABTS \bullet^+



DPPH \bullet

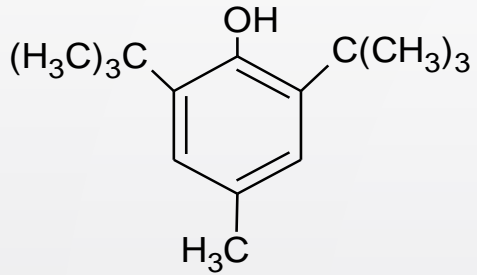


Fotoquimioluminiscencia

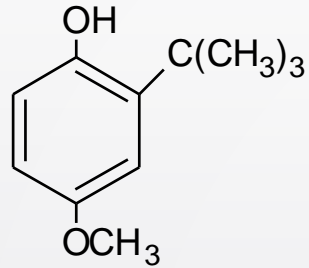


COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EVALUADOS

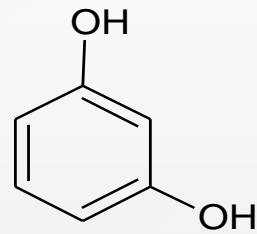
BHT



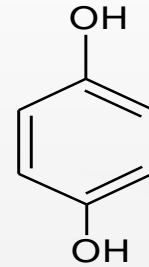
BHA



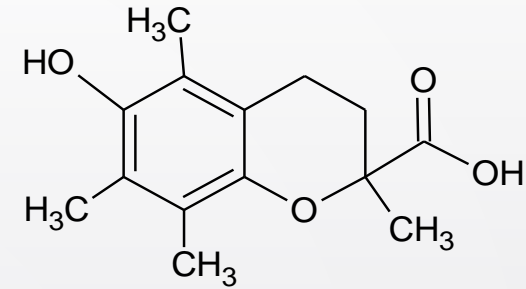
Resorcinol



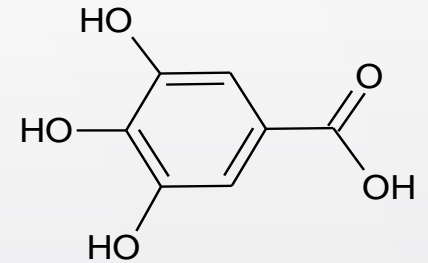
Hidroquinona



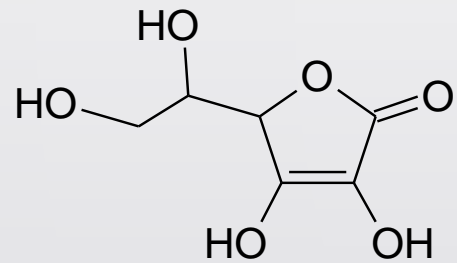
Trolox



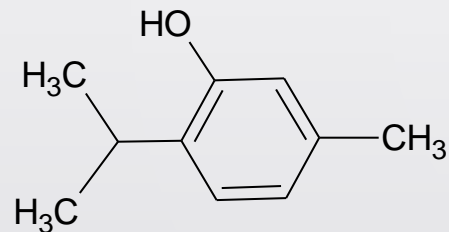
Ácido Gálico



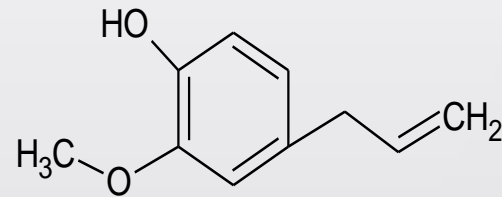
Ácido ascórbico



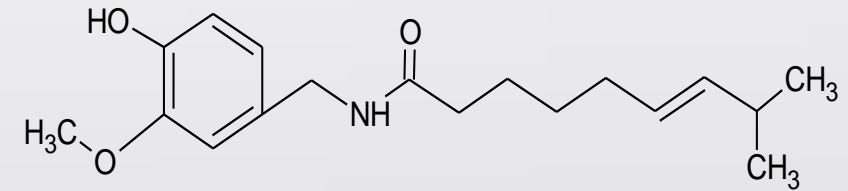
Timol



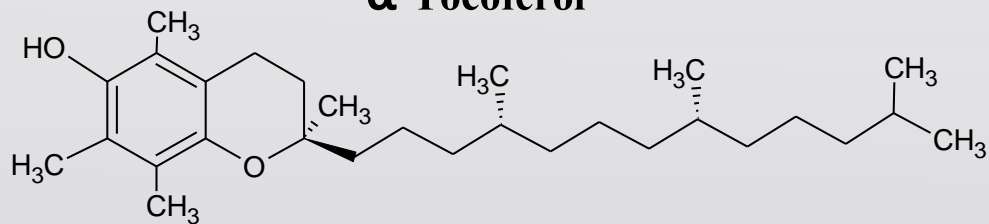
Eugenol



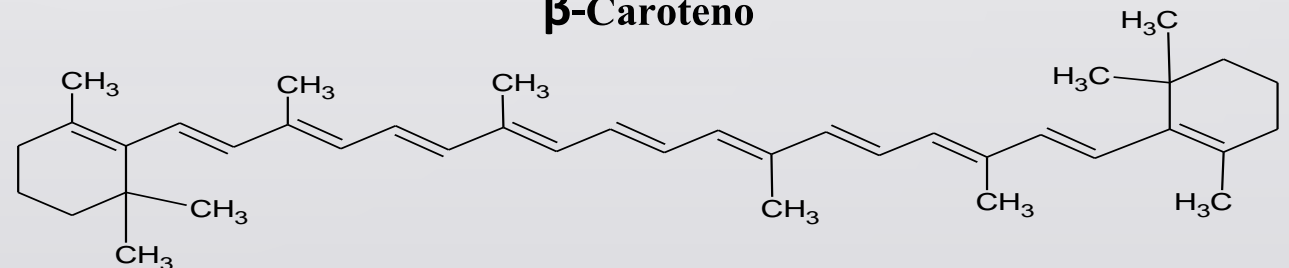
Capsaicina



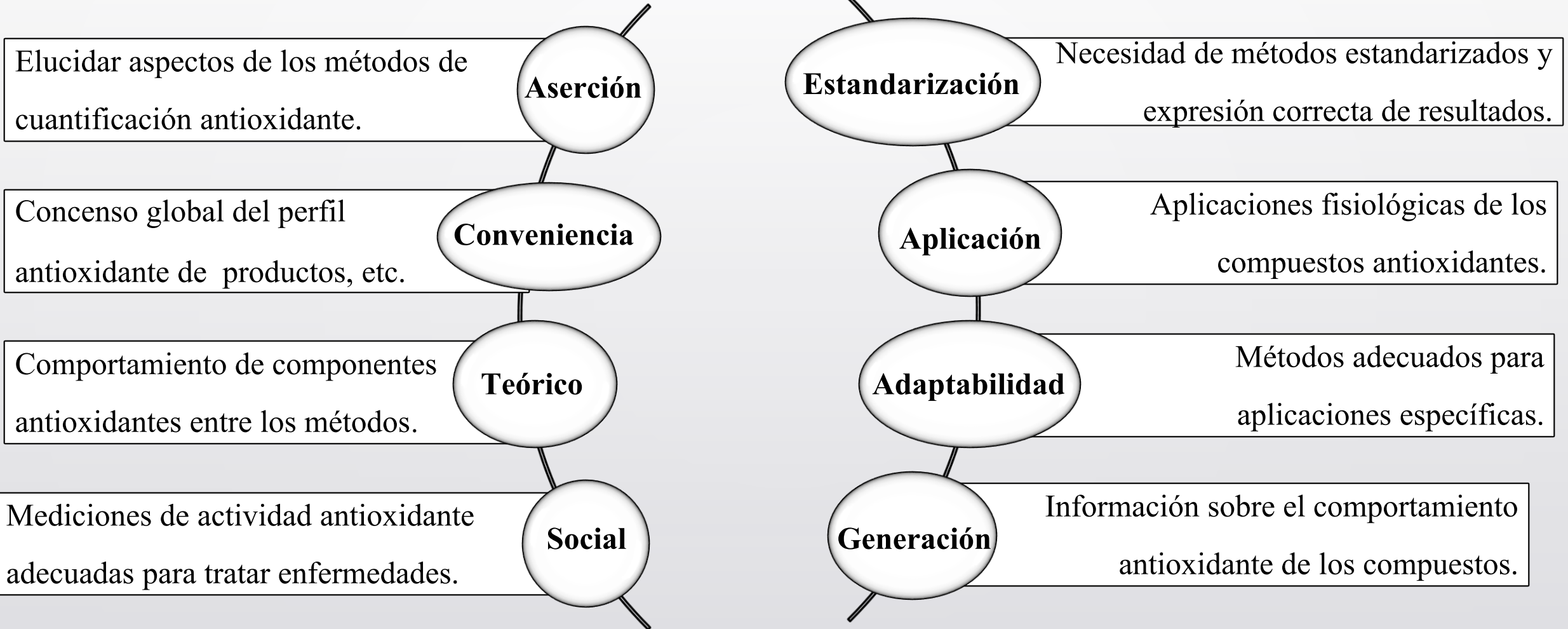
α -Tocoferol



β -Caroteno

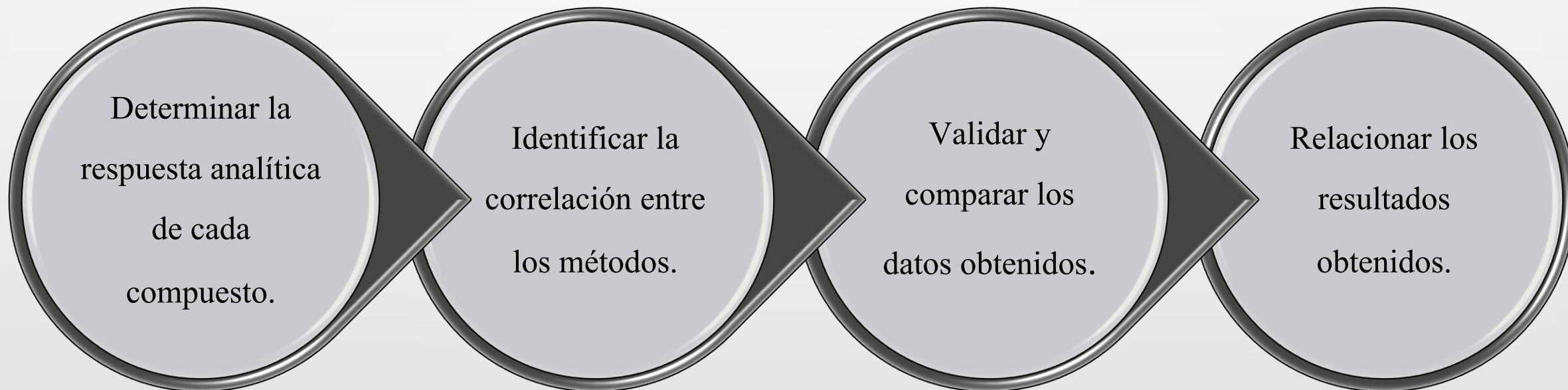


JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA



OBJETIVOS

Evaluar la respuesta analítica a la actividad antioxidante utilizando los métodos considerados, frente a estándares antioxidantes, para establecer criterios de semejanza, sensibilidad, y metodología experimental.

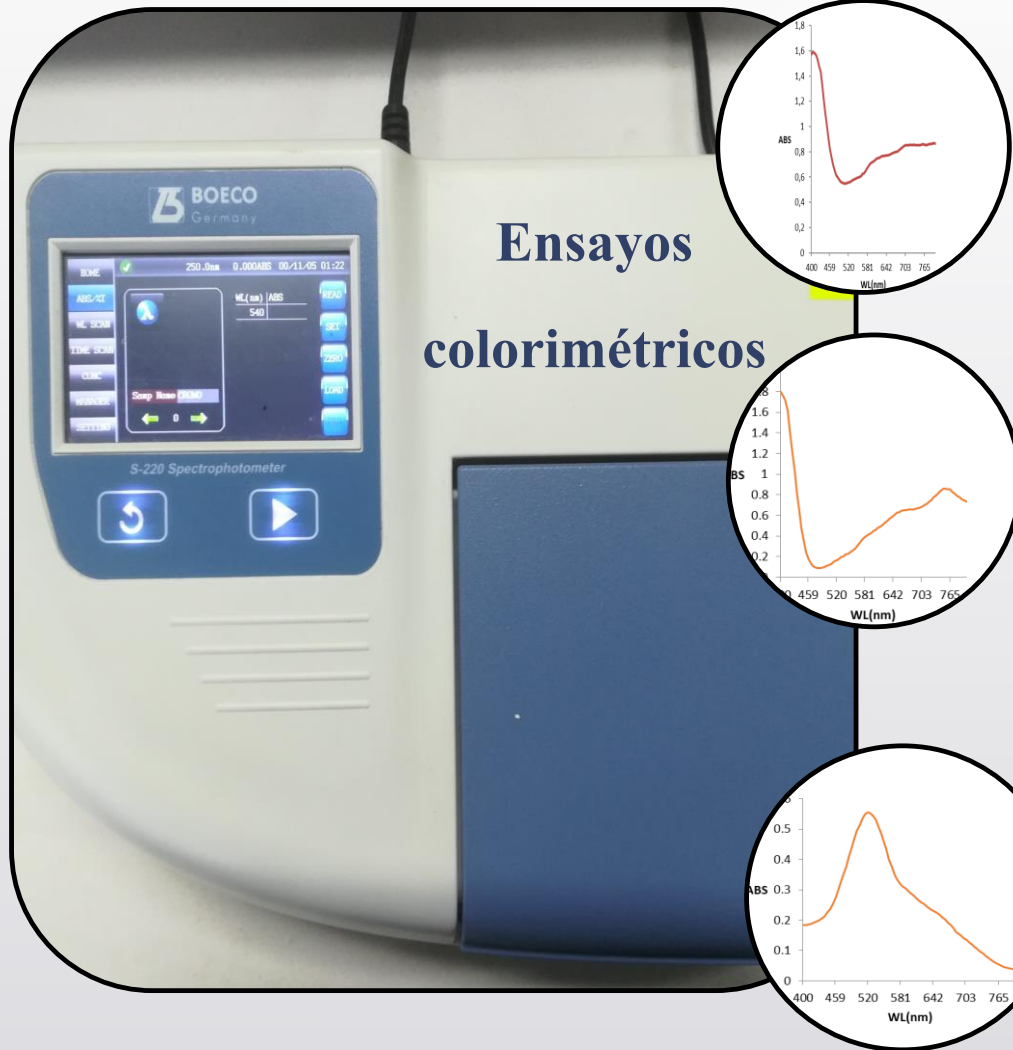


- Desarrollo apropiado de los procedimientos experimentales para establecer modificaciones

- Comparación simultánea de los resultados para estimar la predictibilidad de valores.

- Análisis de varianza.
Contrastes estadísticos para establecer criterios de estandarización .

- Relaciones lineales para predecir resultados y dar relevancia al trabajo.



Folin

Ciocalteu

765 nm

ABTS•⁺

740 nm

DPPH•

520nm

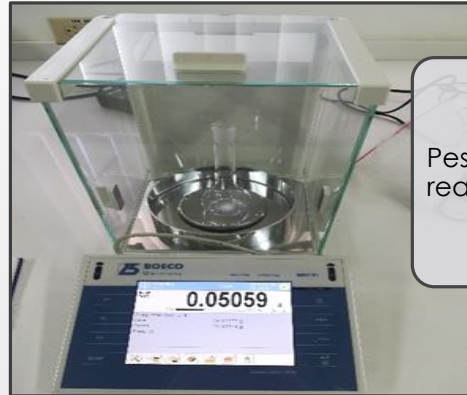


PRIMERO



Estándares Antioxidantes

SEGUNDO

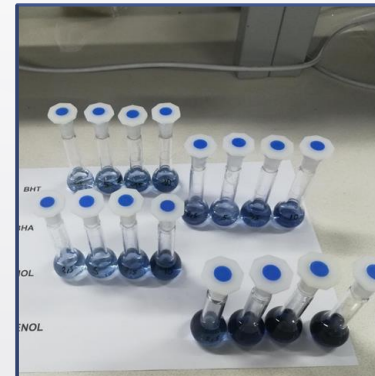


Pesado de reactivos

TERCERO

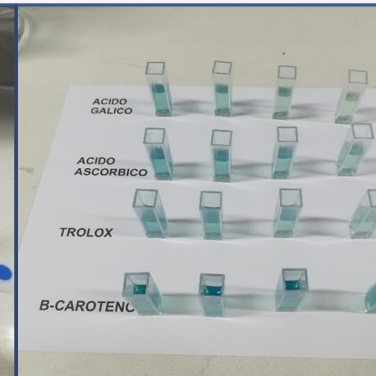


Soluciones Stock



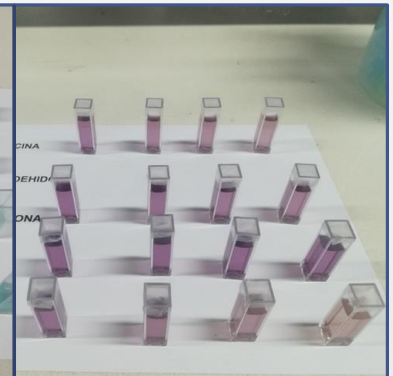
Folin Ciocalteu

- 1 hora FC + 1 hora Carbonato
- Medición directa del balón.



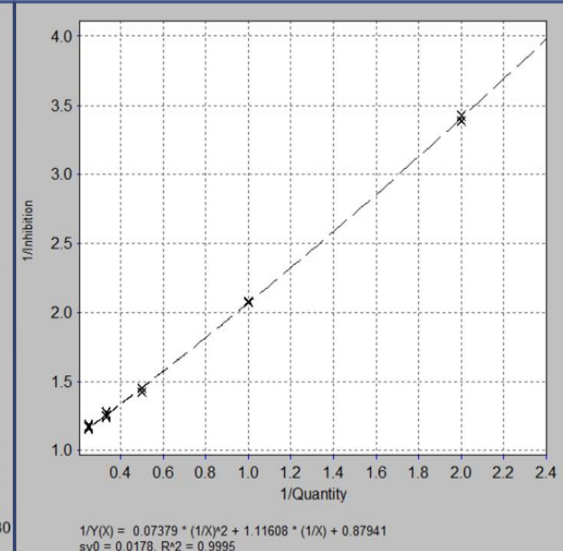
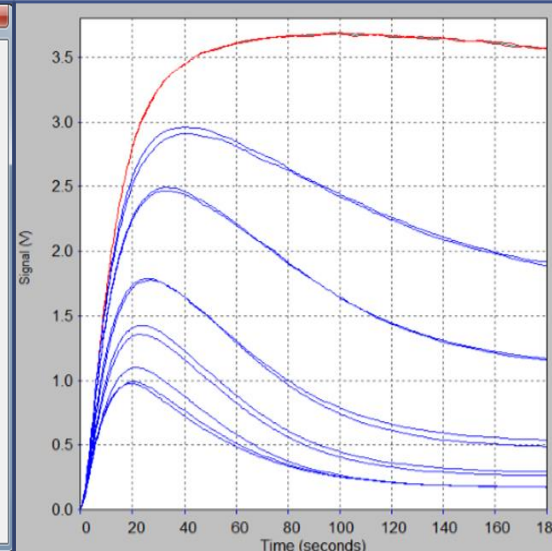
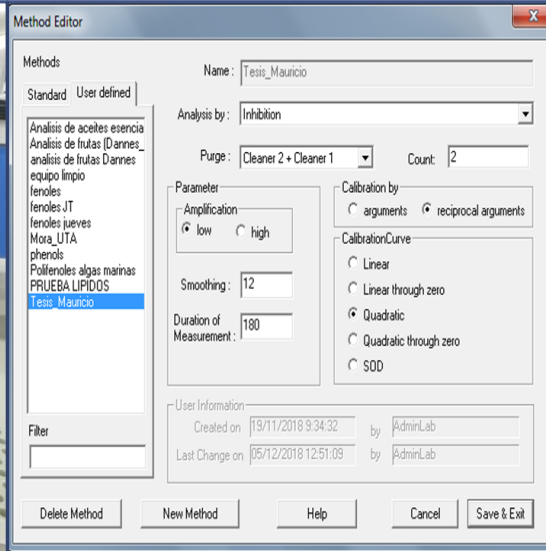
ABTS

- Medición exacta en 6 min
- Preparación en cubetas de medida



DPPH

- Medición exacta en 5 minutos
- Preparación en cubetas de medida



PHOTOCHEM

PARÁMETROS DEL MÉTODO

- Amplificación baja.
- Doble purga entre mediciones.
- Purga con metanol y agua.
- Calibración cuadrática.
- Análisis por inhibición

RESPUESTA DEL EQUIPO

- Señal (V) VS Tiempo.
- Mediciones individuales.
- Análisis de curvas.
- Rango de concentraciones específico.

CURVA DE CALIBRADO

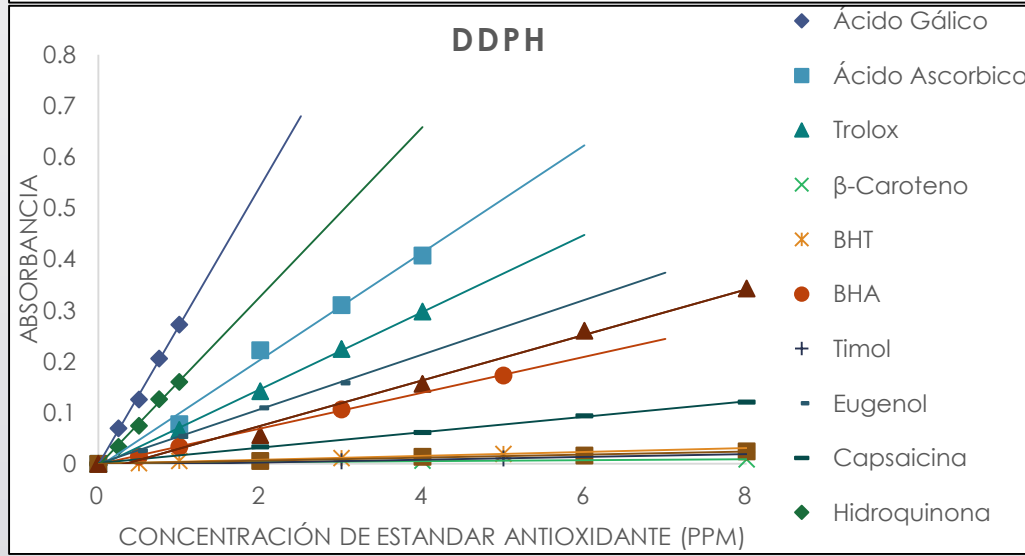
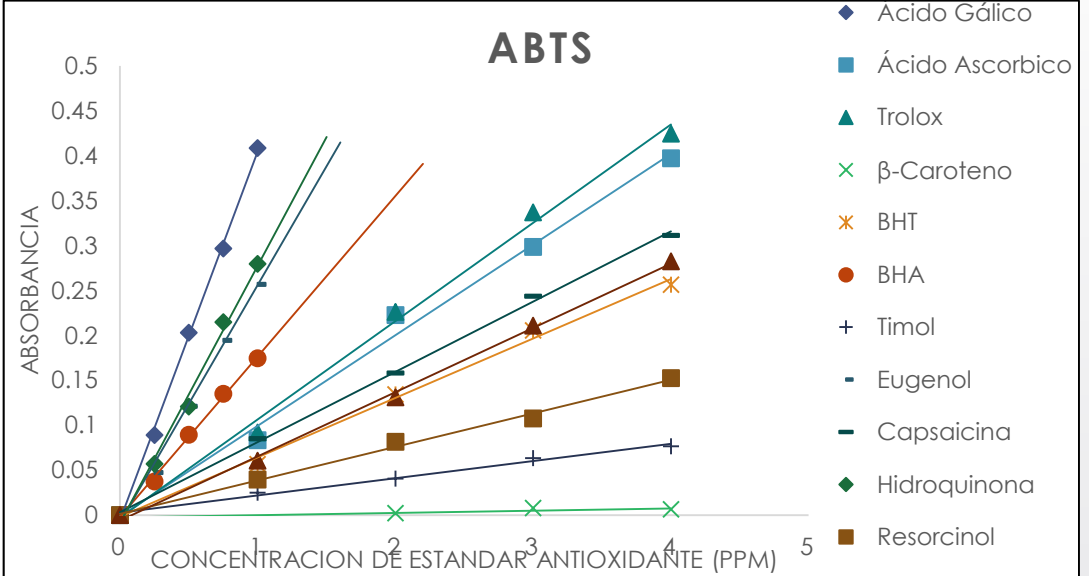
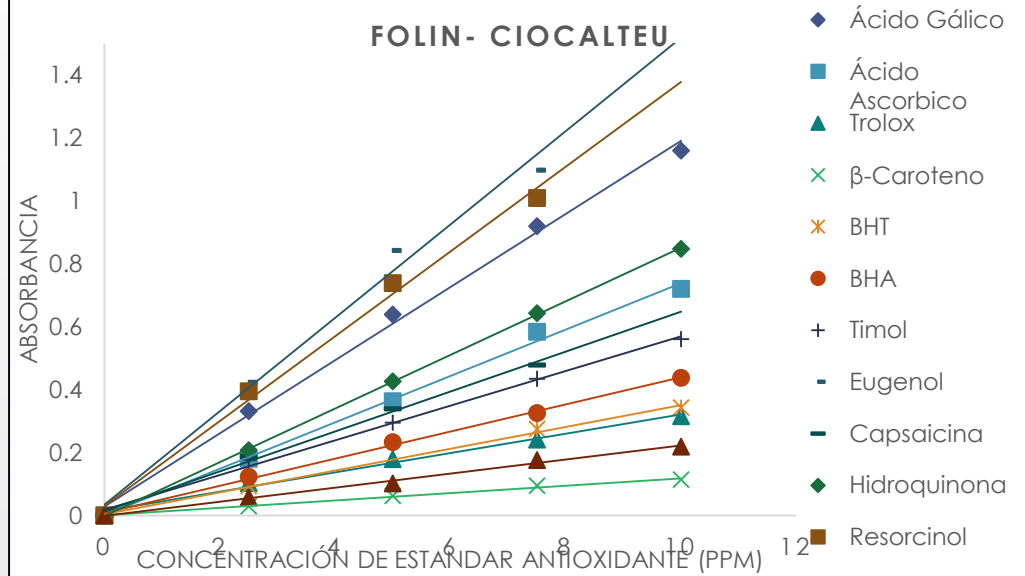
- Manipulación de curvas de calibrado
- Linealización por argumentos recíprocos.



RESULTADOS



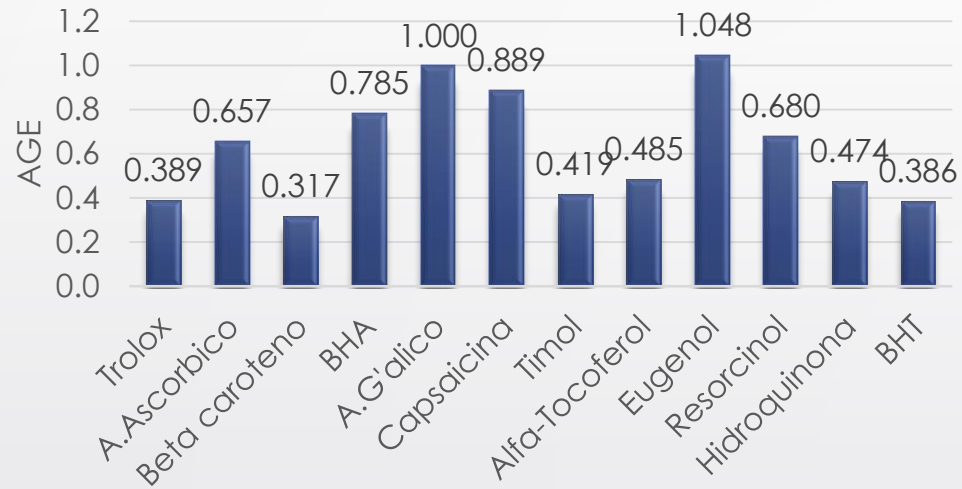
CURVAS DE CALIBRACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES MÉTODOS



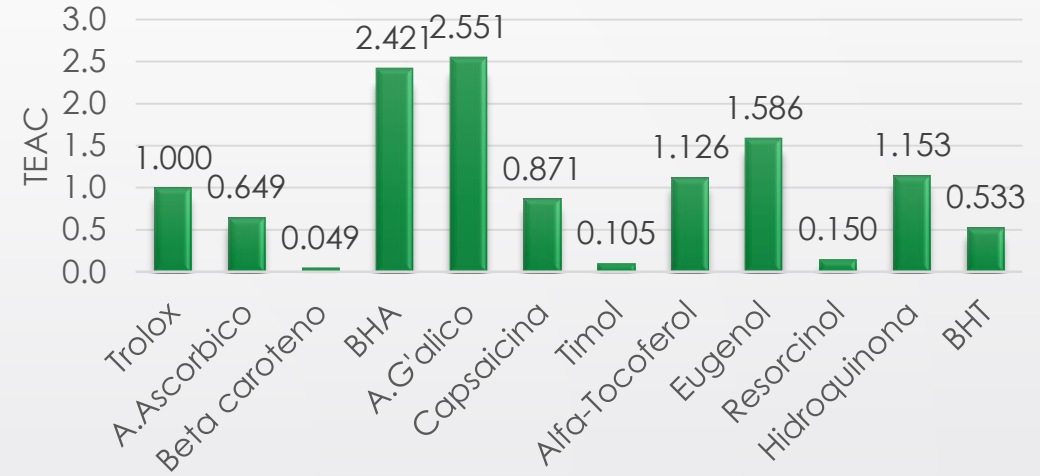
Compuesto	FOLIN-CIOCALTEU R ²	DPPH R ²	ABTS R ²
A.Gálico	0.9963	0.9978	0.9986
A.Ascórbico	0.9962	0.9926	0.9922
Trolox	0.9914	0.9987	0.9953
β-Caroteno	0.9933	0.9268	0.6372
BHT	0.9974	0.9879	0.9956
BHA	0.998	0.9993	0.9974
Timol	0.9954	0.8590	0.9905
Eugenol	0.9880	0.9991	0.9953
Capsaicina	0.9952	0.9986	0.9986
Hidroquinona	0.9998	0.9946	0.9927
Resorcinol	0.9932	0.9811	0.9948
α-Tocoferol	0.99424	0.9918	0.9979

RESPUESTA ENTRE LOS MÉTODOS

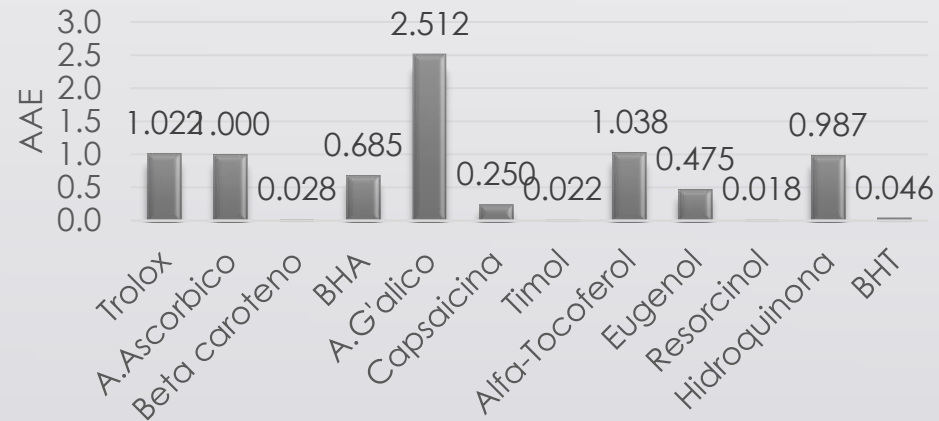
Folin-Ciocalteu



ABTS



DPPH



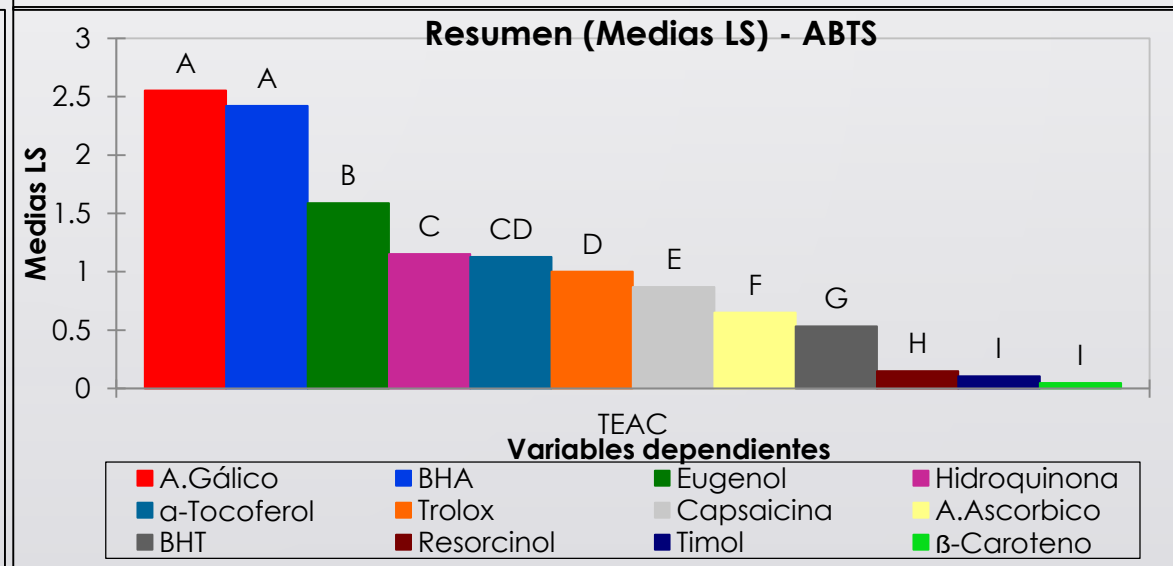
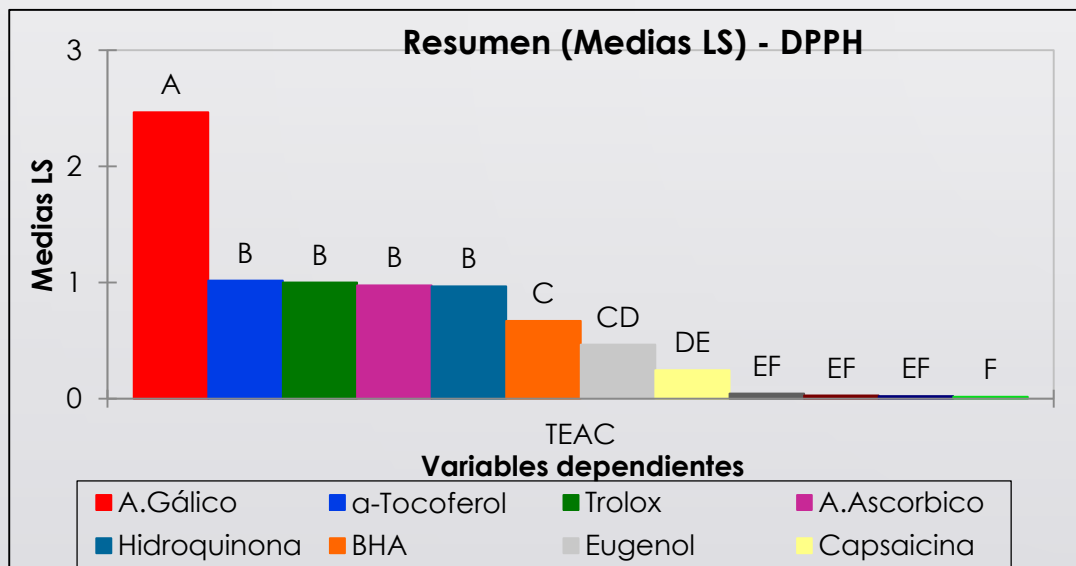
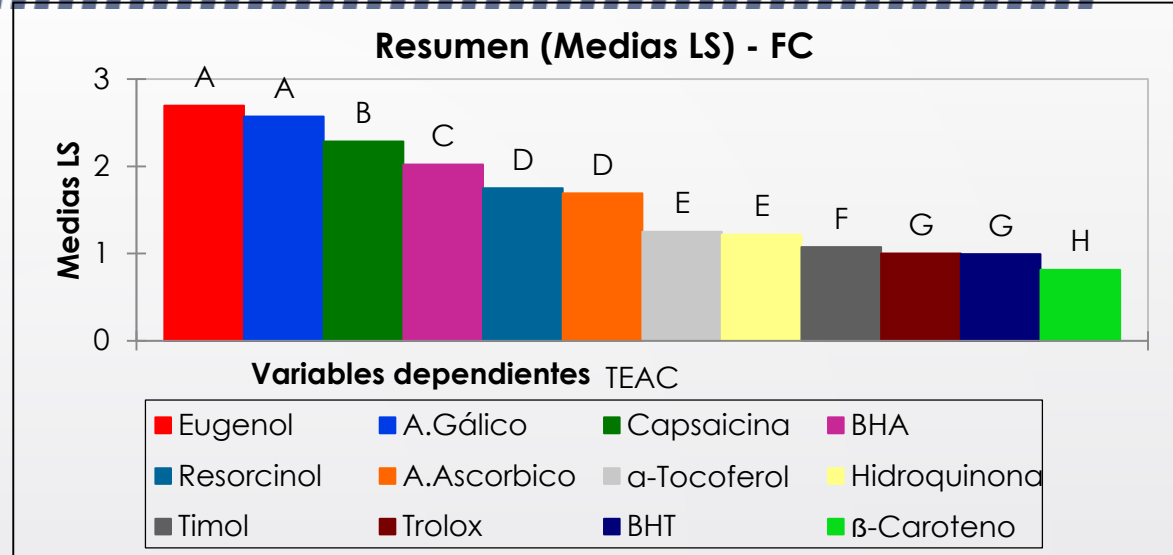
PCL



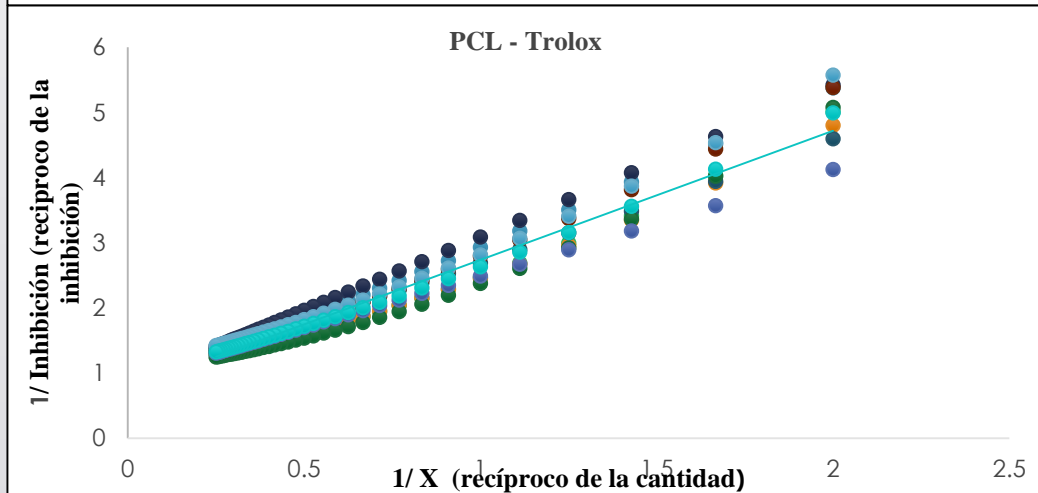
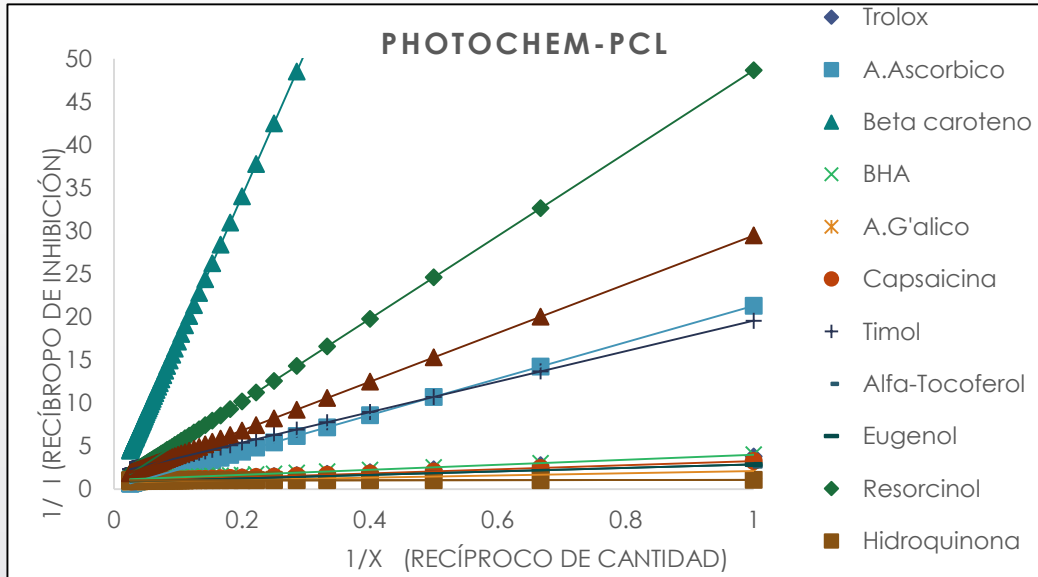
RESUMEN DE PRUEBAS TUKEY Y DUNNETT

Estandares	valores obtenidos de las diferentes replicas				Media (AOA)		
Muestra 1(BHT)	X_{11}	X_{12}	...	X_{1j}	...	X_{1n}	\bar{X}_1
Muestra 2 (BHA)	X_{21}	X_{22}	...	X_{2j}	...	X_{2n}	\bar{X}_2
Muestra i (etc)	X_{i1}	X_{i2}	...	X_{ij}	...	X_{in}	\bar{X}_i
Muestra n (12 AO)	X_{h1}	X_{h2}	...	X_{hj}	...	X_{hn}	\bar{X}_h

Media Global. Gran total = T



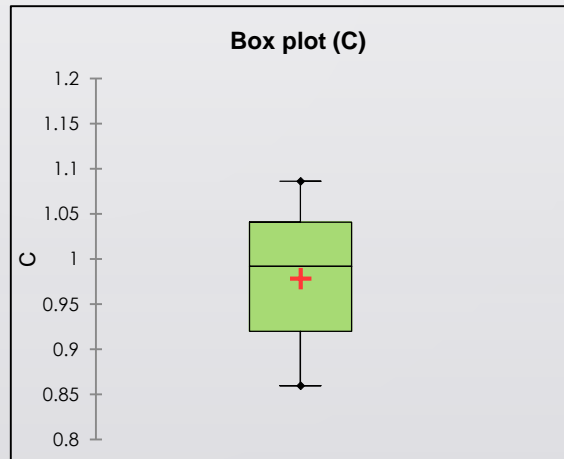
MÉTODO FOTOQUIMIOLUMINISCENCIA



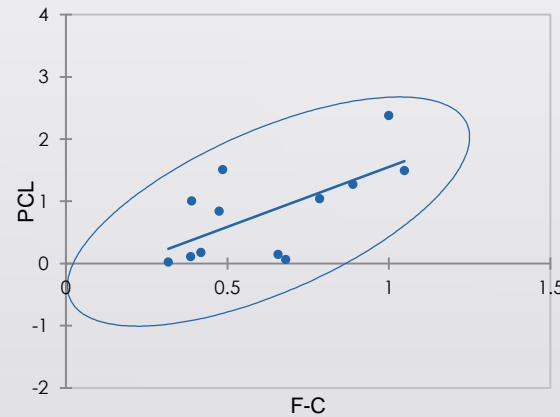
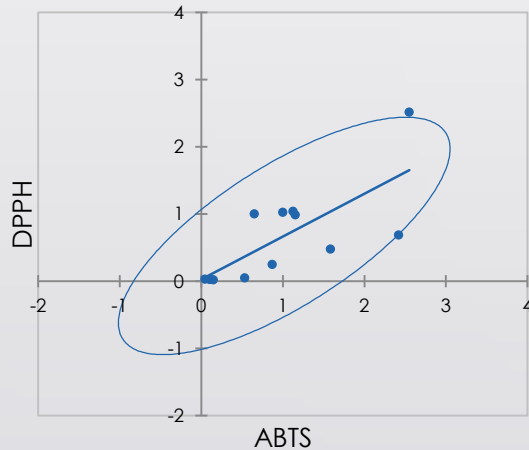
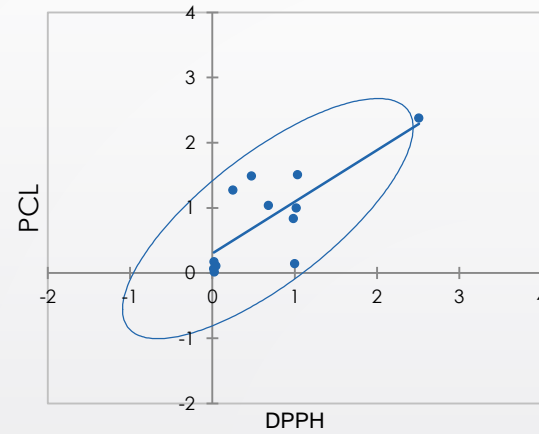
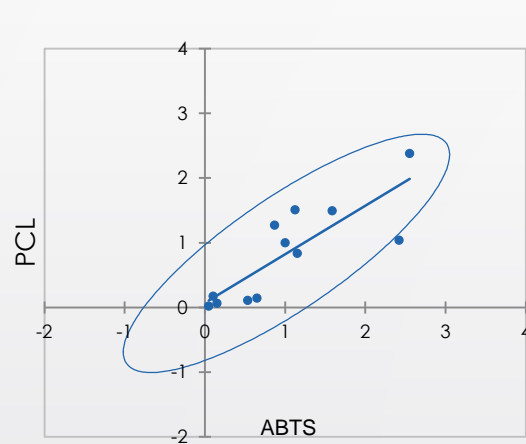
$$Y = mX + C$$

Estadístico	C
No. de observaciones	10
Mínimo	0.859
Máximo	1.086
1° Cuartil	0.920
Mediana	0.992
3° Cuartil	1.041
Media	0.978
Varianza (n-1)	0.006
Desviación típica (n-1)	0.079

Compuesto	PCL R ²
A.Gálico	0.9991
A.Ascorbico	0.9984
Trolox	0.999
β-Caroteno	0.9986
BHT	0.9992
BHA	0.9993
Timol	0.9958
Eugenol	0.9992
Capsaicina	0.9996
Hidroquinona	0.9994
Resorcinol	0.9962
α-Tocoferol	0.9998



CORRELACIÓN ENTRE MÉTODOS Y RELACIONES PROPUESTAS



Variables	F-C	ABTS	DPPH	PCL
F-C	1	0.651	0.383	0.650
ABTS	0.651	1	0.733	0.829
DPPH	0.383	0.733	1	0.758
PCL	0.650	0.829	0.758	1

Relación Lineal entre métodos con resultados en TEAC	Coefficientes de correlación
$TEAC_{PCL} = 0.753 TEAC_{ABTS} + 0.0795$	0.829
$TEAC_{PCL} = 0.8217 TEAC_{DPPH} + 0.3162$	0.758
$TEAC_{DPPH} = 0.6247 TEAC_{ABTS} + 0.025$	0.733
$TEAC_{PCL} = 0.7761 TEAC_{F-C} + 0.4447$	0.650
$TEAC_{ABTS} = 0.8276 TEAC_{F-C} - 0.3191$	0.651
$TEAC_{DPPH} = 0.4147 TEAC_{F-C} - 0.0092$	0.383

Relación Lineal entre métodos	Coefficiente de correlación
$TEAC_{PCL} = 0.753 TEAC_{ABTS} + 0.0795$	0.829
$TEAC_{PCL} = 0.8051 \text{ Á. Ascorbico } E_{DPPH} - 0.316$	0.758
$\text{Á. Ascorbico } E_{DPPH} = 0.6367 TEAC_{ABTS} + 0.0265$	0.733
$TEAC_{PCL} = 1.996 \text{ Á. Gálico } E_{F-C} - 0.4449$	0.650
$TEAC_{ABTS} = 2.1288 \text{ Á. Gálico } E_{F-C} - 0.3195$	0.651
$\text{Á. Ascorbico } E_{DPPH} = 1.0871 \text{ Á. Gálico } E_{F-C} + 0.0086$	0.383

PREDICTIBILIDAD DE VALORES

La investigación realizada por Thaipong, Boonprakob et al. (2006), presenta resultados del análisis de Actividad antioxidante llevada a cabo en extractos de Guava por varios métodos.

$$TEAC_{DPPH} = 0.6247 TEAC_{ABTS} + 0.025$$

Genotipo	ABTS (TEAC)	DPPH (TEAC)
Allahabad	37.9 ± 3.4	32.07 ± 5.1
Fan Retief	34.47 ± 2.1	27.77 ± 1.7
Ruby	22.37 ± 0.9	16.27 ± 1
Selección Avanzada	29.67 ± 2.3	24.97 ± 0.5
Media de ensayo	31.17 ± 6.8	25.27 ± 6.7

<i>TEAC_{DDPH}</i>
23.7
21.55
14
18.55
19.49

Fuente: (Thaipong, Boonprakob et al. 2006)

PREDICTIBILIDAD DE VALORES

Przygodzka, Zielińska et al. (2014), desarrolla el análisis de actividad antioxidante en especias utilizando varios métodos.

$$\text{TEAC}_{ABTS} = 0.9148 \text{ TEAC}_{PCL} + 0.2396$$

Especie	ABTS (umol TX/gr masa seca)	PCL (umol TX/ gr masa seca)
Anís Estrellado	66.8 ± 1.3	22.2 ± 0.7
Canela	1057.1 ± 19.3	454.9 ± 17.1
pimienta	280.2 ± 1.5	126 ± 7.7
clavo	926.8 ± 64.2	805.6 ± 3.9
mezcla de especias	124.2 ± 0.5	18.4 ± 0.2
nuez moscada	358.5 ± 19.2	41.4 ± 5.6
Jengibre	52.8 ± 0.2	73.2 ± 6
Vainilla	102.3 ± 14.7	159.6 ± 0.5
Hinojo	26.8 ± 0.4	21.5 ± 0.7
Anís	12.7 ± 0.8	18 ± 0.2
Cardamomo	23.7 ± 0.4	12 ± 0.4
Pimienta blanca	40.4 ± 2.1	20.7 ± 0.1
cilantro	5.6 ± 0.5	9.2 ± 0.3

Fuente: (Przygodzka, Zielińska et al. 2014)

$$\text{TEAC}_{PCL} = 0.753 \text{ TEAC}_{ABTS} + 0.0795$$

Especie	TEAC ABTS	TEAC PCL
Anís Estrellado	20.54816	50.3799
Canela	416.3821	796.0758
pimienta	115.5044	211.0701
clavo	737.2025	697.9599
mezcla de especias	17.07192	93.6021
nuez moscada	38.11232	270.03
Jengibre	67.20296	39.8379
Vainilla	146.2417	77.1114
Hinojo	19.9078	20.2599
Anís	16.706	9.6426
Cardamomo	11.2172	17.9256
Pimienta blanca	19.17596	30.5007
cilantro	8.65576	4.2963

COMPARACIÓN DE RESULTADOS

- La investigación realizada por Berker, Ozdemir Olgun et al. (2013), compara los valores obtenidos entre varios métodos de análisis

antioxidants	modified Folin–Ciocalteu method	original Folin–Ciocalteu method	CUPRAC	ABTS	FRAP
trolox	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
quercetin	2.78	1.80	5.77	3.98	2.92
gallic acid	1.78	2.54	3.25	4.17	1.85
ferulic acid	1.88	5.59	1.47	1.70	0.87
caffeic acid	2.61	5.54	2.89	1.39	1.13
catechin	3.23	10.6	3.10	2.40	1.24
vitamin E	0.39	2.04	1.02	1.00	
BHT	0.82	2.92	0.77	0.98	
BHA	0.99	3.16	1.57	1.23	
TBHQ	1.90	1.38	1.02	1.20	
LG	1.30	4.54	1.68	2.26	
ascorbic acid	1.60		1.03	0.99	1.01
β -carotene	0.34	0.72	1.75	2.14	
rosmarinic acid	4.08	10.5	5.2		
glutathione	1.02	1.60	0.64	1.51	
cysteine	0.66	0.82	0.39	1.28	

Fuente: (Berker, Ozdemir Olgun et al. 2013)

	F-C	ABTS
Trolox	1.000	1.000
Á. Ascórbico	1.690	0.649
β -Caroteno	0.815	0.049
BHA	2.020	2.421
Á. Gálico	2.570	2.551
Capsaicina	2.285	0.871
Timol	1.076	0.105
α -Tocoferol	1.249	1.126
Eugenol	2.694	1.586
Resorcinol	1.750	0.150
Hidroquinona	1.219	1.153
BHT	0.994	0.533

CONCLUSIONES



- El método de Folin-Ciocalteu determina la actividad antioxidante de componentes liposolubles utilizando como primer diluyente al etanol, y como segundo diluyente agua.
- El ácido gálico y el eugenol son los antioxidantes más efectivos para expresar la actividad antioxidante debida al contenido total fenólico encontrado mediante F-C.
- Los métodos $ABTS^{\bullet+}$ y PCL; se correlacionan positivamente (0.829). Los resultados son predecibles en muchos casos entre métodos.
- No existe correlación favorable entre los métodos DPPH y F-C.
- El ácido gálico es el compuesto más activo de los antioxidantes estudiados ya que representa una mayor sensibilidad en todos los métodos empleados.
- La hidroquinona es el compuesto con mayor actividad frente a radicales superóxidos ($O_2^{\bullet-}$).
- El BHA es el compuesto lipofílico mas activo entre los métodos. Su participación en cada caso es representativa y superior a la del Trolox.
- El método TEAC/ $ABTS^{\bullet+}$, es más sensible al ácido gálico, BHA, y eugenol.
- El método con radical DPPH \bullet , es menos susceptible a factores estéricos o de resonancia.
- Los ensayos basados en mecanismos (HAT) son más prácticos que los (SET).

RECOMENDACIONES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS



- En base a los resultados de este trabajo se recomienda que para los ensayos estudiados los antioxidantes más efectivos para expresar resultados es el ácido gálico y el BHA para componentes hidrosolubles y liposolubles respectivamente.
- Los ensayos que utilizan el criterio de fase de retraso usualmente son los basados en mecanismos (HAT), es recomendable utilizar como estándar de referencia al compuesto más activo que en este caso continúa siendo el ácido gálico o BHA dependiendo del caso.
- Es necesario coincidir en las modificaciones que se realizan a los ensayos para adaptarlos a diferentes circunstancias de análisis. Sin embargo, también existe el riesgo de realizar cambios innecesarios a los métodos por lo tanto es recomendable comparar los cambios que se puedan ocasionar en la señal de respuesta frente a las modificaciones empleadas y llevar un registro de esto.
- Para tomar en cuenta las diferentes señales de respuesta que tienen los antioxidantes individuales en los diferentes métodos y dar un estimado aceptable de actividad, es recomendable desarrollar un método aritmético que permita relacionar la sensibilidad de los métodos con diferentes compuestos estudiados para incluir el resultado de actividad dependiendo del caso.
- Por último, para estandarizar la cuantificación del perfil antioxidante de un compuesto y que los resultados sean comparables, es importante desarrollar nuevos métodos que abarquen el comportamiento de los antioxidantes frente a radicales cuya actividad es características en sistemas biológicos de esta forma los resultados serán más relevantes y los procedimientos de los métodos podrán ser reajustados para llevar a cabo este tipo de determinaciones.