



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**“ESTUDIO DEL SISTEMA ABTS/LACASA PARA SU  
APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE LA  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**IA VIOLETA UGALDE BENÍTEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JORGE SORIANO SANTOS**

**FEBRERO DE 2008**

Iztapalapa, D. F., a 6 de Febrero de 2008

El jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis

**ESTUDIO DEL SISTEMA ABTS/LACASA PARA SU APLICACIÓN EN LA  
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALIMENTOS**

que presentó la alumna

Violeta Ugalde Benítez

**Comité Tutorial**

**Director de tesis:** Doctor Jorge Soriano Santos  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

**Asesor :** Doctora Isabel Guerrero Legarreta.  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

**Asesor:** Doctora Lidia Dorantes Álvarez  
*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN*

**Comité de Evaluación**

Presidente:  
Dra. Isabel Guerrero Legarreta  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

---

Secretario:  
Dr. Salvador Tello Solís  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

---

Vocal:  
Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional

---

Vocal:  
Dra. Lidia Dorantes Álvarez  
*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
del Instituto Politécnico Nacional*

---

A MI FAMILIA CON CARIÑO.  
EN ESPECIAL A MI MADRE,  
POR SER MI GRAN APOYO Y  
UN EJEMPLO DE FUERZA,  
LUCHA Y CONSTANCIA.

## *Agradecimientos*

A mi familia, por su gran apoyo y cariño incondicional.

A mis amigos, por su sinceridad y compañía.

Al Doctor Jorge Soriano Santos por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A los asesores y evaluadores que con su oportuna participación ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

## RESUMEN

Los antioxidantes retrasan o impiden el proceso de oxidación de los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos al combatir a los radicales libres que se producen por los diversos procesos metabólicos en la célula. Estos compuestos son conocidos como especies reactivas del oxígeno y son la causa de algunas de las enfermedades que padece el humano como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson), entre otras. Por lo que, el consumo de antioxidantes a través de la dieta puede reducir el riesgo de padecer este tipo de enfermedades.

El potencial antioxidante que un alimento presenta para neutralizar o reducir radicales libres se puede determinar al estimar la capacidad antioxidante total, es decir, la actividad antioxidante combinada de los compuestos antioxidantes presentes en un alimento.

En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos analíticos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias, sin embargo, muchos de estos métodos requieren de reactivos costosos, equipos sofisticados o tiempos prolongados para realizar las determinaciones.

En este trabajo se desarrolló un método rápido, sencillo y reproducible para evaluar la capacidad antioxidante de muestras de alimentos. Para ello, se propuso el uso de un sistema modelo "ABTS/lacasa", que incluye el compuesto cromógeno 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) y lacasa, que es una polifenoloxidasas que genera radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  en presencia de oxígeno molecular. Para el desarrollo del método se evaluaron dos fuentes de lacasa para la generación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$ : utilizando directamente el producto comercial DeniLite IIS y la lacasa extraída del árbol japonés *Rhus vernicifera*. Ambas fuentes enzimáticas se

caracterizaron espectrofotométricamente, para descartar interferencias y para determinar la longitud de onda de detección de los radicales ABTS<sup>•+</sup> que se estableció a  $\lambda = 728$  nm. Por otro lado, se evaluó el efecto del pH y la concentración de enzima en la generación de tiempos lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>. Para realizar lo anterior, se utilizaron antioxidantes estándares como los ácidos: gálico, ferúlico y L-(+)-ascórbico. Se encontró que los sistemas ABTS/lacasa de DeniLite IIS o de *Rhus vernicifera* permiten observar tiempos lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> que se correlacionan con la concentración del antioxidante, ajustándose al modelo  $y = mx+b$ . Las condiciones donde se obtuvieron los tiempos lag de formación del radical ABTS<sup>•+</sup> para el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS utilizando 3 diferentes antioxidantes a distintas concentraciones fueron:  $63.4 \pm 5.8$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C. Por su parte, las condiciones donde se obtuvieron los tiempos lag de formación del radical ABTS<sup>•+</sup> para el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* utilizando 3 diferentes antioxidantes a distintas concentraciones fueron:  $172.6 \pm 11.9$  U/mL de lacasa y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C. Finalmente, los métodos desarrollados se aplicaron para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras: olote de maíz, rastrojo de amaranto y jugo de naranja fresco. Los sistemas evaluados en este trabajo se compararon con el sistema ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidasa de rábano (HRP) y se observó que los sistemas propuestos permitieron obtener el mismo orden decreciente de la capacidad antioxidante total de los extractos hidrosolubles de los alimentos de prueba, es decir, jugo de naranja > olote de maíz > rastrojo de amaranto. En conclusión el método que utiliza el sistema ABTS/lacasa es un método sencillo que se puede aplicar para la evaluación de la capacidad antioxidante total de alimentos, debido a que es sensible para diferenciar el poder antioxidante de diferentes fuentes, de la misma manera como sucede en el sistema ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP que se utiliza actualmente.

## SUMMARY

Antioxidants are defined as chemical compounds able to delay or prevent oxidation reactions in carbohydrates, proteins, lipids and nucleic acids. The main mechanism involved in antioxidation is free radicals inactivation, that otherwise can start the deterioration of several cell metabolic processes. Free radicals and oxidants are oxygen-reactive compounds, being the cause of some chronic-degenerative diseases in human beings, such as cancer and cardiovascular conditions, among others. Inclusion of antioxidants in the diet may reduce the risk of such diseases onset. The antioxidant potential of a given food, making it able to neutralize or reduce free radicals, can be analyzed through its total antioxidant potential; this is a combination of the antioxidant activity of various compounds present in the food. A wide variety of *in vitro* methods have been developed during the last years for accurately analyze the antioxidant capacity of a number of substances. However, most of these methods require expensive reagents, sophisticated equipment as well as being time-consuming. The objective of this thesis was to develop a fast, simple and reproducible method to analyze the antioxidant capacity of food samples.

A model ABTS/lacasse system was developed; it consisted on a chromogen [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid), ABTS] and lacasse, an ABTS<sup>•+</sup> free radical-generating polyphenoloxidase when in the presence of molecular oxygen. In order to generate free radicals, two lacasse sources were studied: DeniLite IIS<sup>TM</sup>, a commercial product; and a lacasse extracted from the Japanese tree *Rhus vernicifera*. Both enzyme sources were spectrophotometrically characterized in order to assure that no interference occurred and to find the optimum detection waveleghth for ABTS<sup>•+</sup> radicals ( $\lambda=728\text{nm}$ ).

pH and enzyme concentration for ABTS<sup>•+</sup> lag time formation were studied, using standards such as gallic, ferulic and L-(+)-ascorbic acids. Both ABTS/laccase sources, DeniLite IIS™ and *Rhus vernicifera*, showed that the ABTS<sup>•+</sup> free radical formation time correlated to the antioxidant concentration, and followed a first order equation ( $y = mx+b$ ) within a response range satisfying the Lambert-Beer Law.

It was observed that, for DeniLite IIS™ ABTS/laccase, the conditions for inhibiting the ABTS<sup>•+</sup> radical formation lag time occurred were:  $0.063 \pm 0.006$  U laccase/mL, 0.5 mM ABTS, 0.1 M acetate buffer, pH 4. ABTS<sup>•+</sup> lag time inhibition for the *Rhus vernicifera* ABTS/laccase conditions were:  $0.17 \pm 0.012$  U laccase/mL, 0.5 mM ABTS, 0.1 M acetate buffer, pH 4.0.

The method developed and the analytical conditions were applied to analyze the antioxidant capacity of three materials: corn cobs, amaranth straw and freshly squeezed orange juice. This method was also compared to the one using ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/raddish peroxide (HRP). It was observed that similar results were obtained using the systems developed in this thesis, and the ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP method. With all three methods, decreasing antioxidant capacity of water soluble extracts obtained from the tested materials was: orange juice>corn cob>amaranth straw.

It was concluded that, the method developed in this thesis, using ABTS/laccase, is simple and reproducible, and is accurately enough to analyze total antioxidant capacity of foods. It is also sensitive to differentiate the antioxidant ability of various sources, with similar sensitivity to the ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP method.



---

**ÍNDICE.****Contenido.****Resumen.**

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>14</b>
1.1 Antecedentes.	14
1.1.1 Especies reactivas derivadas del oxígeno molecular (ROS).	14
1.1.2 Radicales libres.	16
1.1.3 Radical anión superóxido.	19
1.1.4 Peróxido de hidrógeno.	19
1.1.5 Radical hidroxilo.	21
1.1.6 Oxígeno singulete.	21
1.1.7 Ozono.	22
1.1.8 Óxido Nítrico.	22
1.1.9 Ácido hipocloroso (HOCl).	23
1.2 Producción de especies reactivas del oxígeno y radicales libres en sistemas vivos.	23
1.3 Estrés oxidativo y daño celular.	27
1.4 Antioxidantes.	32
1.4.1 Definición.	32
1.4.2 Fuentes de antioxidantes exógenos.	33
1.4.3 Mecanismo de acción de los antioxidantes.	37

---

1.5	Métodos para evaluar la capacidad antioxidante.	40
1.5.1	Método de inhibición del consumo de oxígeno (IOU).	43
1.5.2	Método de inhibición de la autooxidación lipídica.	43
1.5.3	Método de evaluación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).	44
1.5.4	Método de la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).	45
1.5.5	Blanqueamiento de crocina.	46
1.5.6	Blanqueamiento de $\beta$ -caroteno.	47
1.5.7	Método del parámetro total del atrapamiento de radicales por antioxidantes (TRAP).	47
1.5.8	Método de Folin-Cioacalteau (F-C) para la cuantificación de polifenoles.	48
1.5.9	Método de evaluación de la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) o Método ABTS.	49
1.5.10	Método de la prueba del poder antioxidante de reducción del ion hierro (FRAP).	51
1.5.11	Método del 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).	53
1.5.12	Método del N,N-dimetil-p-fenilenediamina (DMPD).	54
1.5.13	Otros métodos de evaluación de la capacidad antioxidante.	54
1.6	Estudios comparativos.	55
1.7	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS).	55
1.8	Lacasa.	59

---

1.9 Sistema ABTS/lacasa.	61
<b>2. JUSTIFICACIÓN.</b>	62
<b>3. OBJETIVOS.</b>	65
<b>4. HIPÓTESIS.</b>	66
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	67
5.1 Enzima lacasa y reactivos.	67
5.2 Preparación de la solución de lacasa de DeniLite IIS.	67
5.3 Preparación de la solución madre de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	68
5.4 Determinación de proteína.	68
5.5 Caracterización espectrofotométrica del sistema ABTS/lacasa.	69
5.6 Determinación de la actividad enzimática de la lacasa.	71
5.7 Efecto del pH en la actividad de la lacasa de: DeniLite IIS y <i>Rhus vernicifera</i> .	71
5.8 Evaluación del efecto del pH y la concentración de lacasa en el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS <sup>•+</sup> .	72

---

5.9 Evaluación del intervalo de linearidad de una curva estándar empleando ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	73
5.10 Extracción de antioxidantes de residuos agroindustriales.	73
5.11 Aplicación del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> en la evaluación de la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos.	74
5.12 Aplicación del método ABTS/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP.	75
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>76</b>
6.1 Caracterización espectrofotométrica del sistema ABTS/lacasa.	76
6.2 Actividad de la lacasa.	87
6.3 Efecto del pH en la actividad de la lacasa.	89
6.4 Evaluación del efecto del pH y la concentración de lacasa en el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS <sup>•+</sup> .	91
6.4.1 Evaluación del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS.	92

---

6.4.2 Evaluación del sistema ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	104
6.5 Evaluación del intervalo de linealidad de una curva estándar, empleando ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	115
6.6 Método ABTS/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP.	118
6.7 Evaluación de la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos.	119
6.8 Perspectivas.	124
<b>7. CONCLUSIONES.</b>	126
<b>8. APÉNDICES</b>	128
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.</b>	132

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución electrónica del oxígeno molecular o triplete y del oxígeno singulete	15
Figura 2.	Las especies reactivas del oxígeno (ROS).	16
Figura 3.	Reducciones sucesivas del oxígeno y formación de especies reactivas del oxígeno.	18
Figura 4.	Reacción de dismutación del anión superóxido.	19
Figura 5.	Reacción de Fenton.	20
Figura 6.	Principales fuentes de radicales libres en el cuerpo y las consecuencias del daño por radicales libres.	25
Figura 7.	Ejemplos de algunas circunstancias que incrementan las concentraciones de radicales libres en las células.	26
Figura 8.	Balance Oxidante-Antioxidante y Estrés oxidativo.	27
Figura 9.	Mecanismos interactivos de los radicales libres que causan daño celular.	28
Figura 10.	Rompimiento de la cadena de formación de radicales libres.	38

Figura 11.	Mecanismo de acción de antioxidantes para prevenir formación de radicales libres.	39
Figura 12.	Estructura molecular del 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH).	46
Figura 13.	Estructura del 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS.	49
Figura 14.	Reacción del ensayo FRAP.	52
Figura 15.	Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).	53
Figura 16.	Estructura química del ABTS.	56
Figura 17.	Oxidación del compuesto ABTS.	57
Figura 18.	Estructura del sitio activo y ciclo catalítico de las lacasas: (a) Modelo del arreglo catalítico de cuatro átomos de cobre de una lacasa fúngica obtenida de <i>Trametes versicolor</i> . (b) Representación esquemática del ciclo catalítico de la lacasa.	60
Figura 19.	Producción del radical $ABTS^{\bullet+}$ por acción de la enzima lacasa en presencia de $O_2$ .	61
Figura 20.	Espectro de absorción a 25 °C de: (a) disolución de DeniLite IIS en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) disolución de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.	77

Figura 21.	Espectro de absorción de disolución de ácido gálico 30 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.	78
Figura 22.	Espectro de absorción a 25 °C de: (a) disolución de DeniLite IIS y ácido gálico 30 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) disolución de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ácido gálico 400 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.	80
Figura 23.	Espectro de absorción a 25 °C de disolución de: (a) ABTS 0.05 mM, 0.06 U/mL de DeniLite IIS y ácido gálico 30 $\mu$ M y (b) ABTS 0.05 mM, 0.16 U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ácido gálico 400 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.	82
Figura 24.	Espectros de absorción a 25 °C de: ABTS 0.05 mM y ABTS <sup>•+</sup> 0.05 mM en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.	83
Figura 25.	Espectro de absorción a 25 °C de una disolución de: ABTS 0.05 mM y ABTS <sup>•+</sup> producido por 0.16 U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.	85
Figura 26	Efecto del pH en la actividad de lacasa a 25 °C de: (a) DeniLite IIS y (b) <i>Rhus vernicifera</i> .	90



Figura 27.	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $0.003\pm 0.0007$ U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador HCl-KCl 0.1 M a pH 2 en presencia de ácido gálico.	93
Figura 28.	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $0.110\pm 0.01$ U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador HCl-KCl 0.1 M pH 2 en presencia de ácido gálico.	94
Figura 29.	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $1.07\pm 0.05$ U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl pH 3 0.1 M en presencia de ácido gálico.	95
Figura 30.	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $0.59\pm 0.06$ U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido gálico.	96
Figura 31.	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $0.06\pm 0.001$ U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido gálico.	97
Figura 32	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $0.06\pm 0.0007$ U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido ferúlico.	100

Figura 33.	Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS $0.07\pm 0.0008$ U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido L-(+)-ascórbico.	102
Figura 34.	Cinéticas a 25 °C de disolución de $0.081\pm 0.003$ U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico.	105
Figura 35.	Cinéticas a 25 °C de disolución de $0.05\pm 0.001$ U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico.	105
Figura 36.	Cinéticas a 25 °C de disolución de $0.38\pm 0.006$ U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl 0.1M pH 3 en presencia de ácido gálico.	106
Figura 37.	Cinéticas a 25 °C de disolución de $0.34\pm 0.02$ U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3 en presencia de ácido gálico.	107
Figura 38.	Cinéticas a 25 °C de disolución de $0.16\pm 0.004$ U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido gálico.	108

- Figura 39. Cinéticas de disolución de  $0.18 \pm 0.007$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido ferúlico. 111
- Figura 40. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.17 \pm 0.014$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido L-(+)-ascórbico. 113
- Figura 41. Curvas de correlación entre concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS. 115
- Figura 42. Curvas de correlación entre concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*. 116
- Figura 43. Curvas de correlación entre concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP. 118

---

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro I.	Antioxidantes exógenos de importancia en la dieta y sus fuentes.	35
Cuadro II.	Ensayos <i>in vitro</i> para determinar la capacidad antioxidante.	42
Cuadro III.	DeniLite IIS disuelto en 5 mL de amortiguador.	68
Cuadro IV.	Mezclas de reacción del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	70
Cuadro V.	Diseño factorial para lacasa de DeniLite IIS.	72
Cuadro VI.	Diseño factorial para lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	72
Cuadro VII.	Actividad de la enzima lacasa de DeniLite IIS y de <i>Rhus vernicifera</i> .	88
Cuadro VIII.	Tiempo lag de formación de radicales ABTS <sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS empleando diferentes concentraciones de ácido gálico.	98
Cuadro IX.	Efecto del ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS.	98
Cuadro X.	Tiempo lag de formación de radicales ABTS <sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS empleando diferentes concentraciones de ácido ferúlico.	101

Cuadro XI.	Tiempo lag de formación de radicales ABTS <sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS empleando diferentes concentraciones de ácido L-(+)-ascórbico.	103
Cuadro XII.	Tiempo lag de formación de radicales ABTS <sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> empleando diferentes concentraciones de ácido gálico.	109
Cuadro XIII.	Efecto del ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> .	110
Cuadro XIV.	Tiempo lag de formación de radicales ABTS <sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> empleando diferentes concentraciones de ácido ferúlico.	112
Cuadro XV.	Tiempo lag de formación de radicales ABTS <sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> empleando diferentes concentraciones de ácido L-(+)-ascórbico.	114
Cuadro XVI.	Capacidad antioxidante total del extracto hidrosoluble en muestras de alimentos.	120

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Antecedentes.**

#### **1.1.1 Especies reactivas derivadas del oxígeno molecular (ROS).**

El oxígeno está presente en el aire en la forma de oxígeno diatómico ( $^3\Sigma_g^-O_2$ ) ó dioxígeno (Beckman y Ames, 1998). El oxígeno se acumuló en la superficie de la tierra en cantidades significativas hace 2 500 000 000 años, la evidencia geológica sugiere que fue creado gracias a la actividad fotosintética de los microorganismos, principalmente por acción de las algas verde-azules (Gutteridge, 1995).

El porcentaje de oxígeno en el aire seco es de aproximadamente 21%, lo cual lo convierte en el segundo elemento más abundante en la atmósfera, sólo después del nitrógeno que está presente en un 78%. Sin embargo, la cantidad de oxígeno presente como parte de las moléculas de agua que forman a los océanos, ríos y lagos, así como las reservas minerales del subsuelo terrestre, lo hacen el elemento más abundante en el planeta (Gutteridge, 1995).

Habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, es decir, como oxígeno molecular u oxígeno triplete ( $O_2$ ). Bajo condiciones normales, el oxígeno molecular es un gas incoloro, inodoro e insípido que se disuelve en agua en una relación de 3 volúmenes de gas por cada 100 volúmenes de líquido. A pesar de ser el principal oxidante para los organismos aerobios, el oxígeno triplete es poco reactivo y no tóxico debido a su estructura electrónica estable (Figura 1) con dos electrones no apareados, con espines paralelos localizados en orbitales moleculares diferentes (Gutteridge, 1995; Halliwell, 2006).

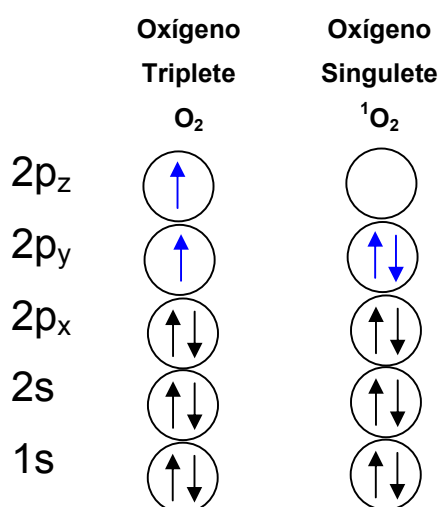


Figura 1. Distribución electrónica del oxígeno molecular o triplete y del oxígeno singlete.

La baja reactividad del oxígeno molecular se debe a que para que el  $O_2$  acepte de manera simultánea dos electrones, éstos deben encontrarse con espines antiparalelos que complementen a los electrones no apareados del  $O_2$ , lo cual es un criterio difícil de satisfacer por un par típico de electrones en orbitales atómicos o moleculares tomando en cuenta el principio de exclusión de Pauli, de manera que el  $O_2$  acepta sólo un electrón a la vez (Beckman y Ames, 1998). Sin embargo, una vez que se altera su distribución electrónica por causas químicas, enzimáticas o por exposición a radiaciones ionizantes su estructura se vuelve muy reactiva al formarse especies químicas conocidas como prooxidantes (algunas de estas especies son radicales libres) capaces de desencadenar una serie de reacciones con otros compuestos presentes en el organismo que pueden provocar daño celular (Venereo, 2002).

El oxígeno al reaccionar forma especies parcialmente reducidas que presentan una elevada reactividad y una vida corta, a las cuales se les ha identificado con el nombre de especies reactivas del oxígeno ó ROS

(Moldovan y Moldovan, 2004). El término ROS (reactive oxygen species, especies reactivas del oxígeno) incluye a los radicales libres derivados del oxígeno y a otras especies que no son radicales pero que pueden participar en la formación de los mismos. Las principales especies reactivas del oxígeno se aprecian en la Figura 2.



Figura 2. Las especies reactivas del oxígeno (ROS).

### 1.1.2 Radicales libres.

Químicamente se define a los radicales libres ( $-R^{\bullet}$ ) como especies químicas muy inestables capaces de existir de manera independiente, que participan en reacciones de transferencia de electrones, ya que en su estructura atómica presentan uno o varios electrones no apareados en el orbital externo (Gutteridge, 1995). Los radicales libres presentan una reactividad alta y una vida media corta, actúan cerca del sitio donde se



forman y son difíciles de dosificar (Venereo, 2002). Los radicales libres derivados del oxígeno reaccionan fácilmente ante cualquier tipo de molécula sin necesidad de energía adicional.

Debido a su elevada energía y a su baja estabilidad, los radicales libres liberan parte de esa energía al reaccionar con otras moléculas. Algunas veces dichas reacciones generan más radicales libres, que al acumularse pueden provocar daño al ADN y a las membranas celulares, contribuyendo de esta manera a la aparición de diversas enfermedades (Simon, 2007).

Los radicales libres derivados del oxígeno se pueden generar a nivel intracelular o extracelular por modificación del sentido de rotación de sus electrones más externos, o por la adición sucesiva de electrones al oxígeno molecular, debido a mecanismos como la respiración y diversas reacciones de oxidación – reducción.

En la Figura 3 se muestra los distintos estados que atraviesa el oxígeno al sufrir una serie de reducciones sucesivas formando especies reactivas del oxígeno.

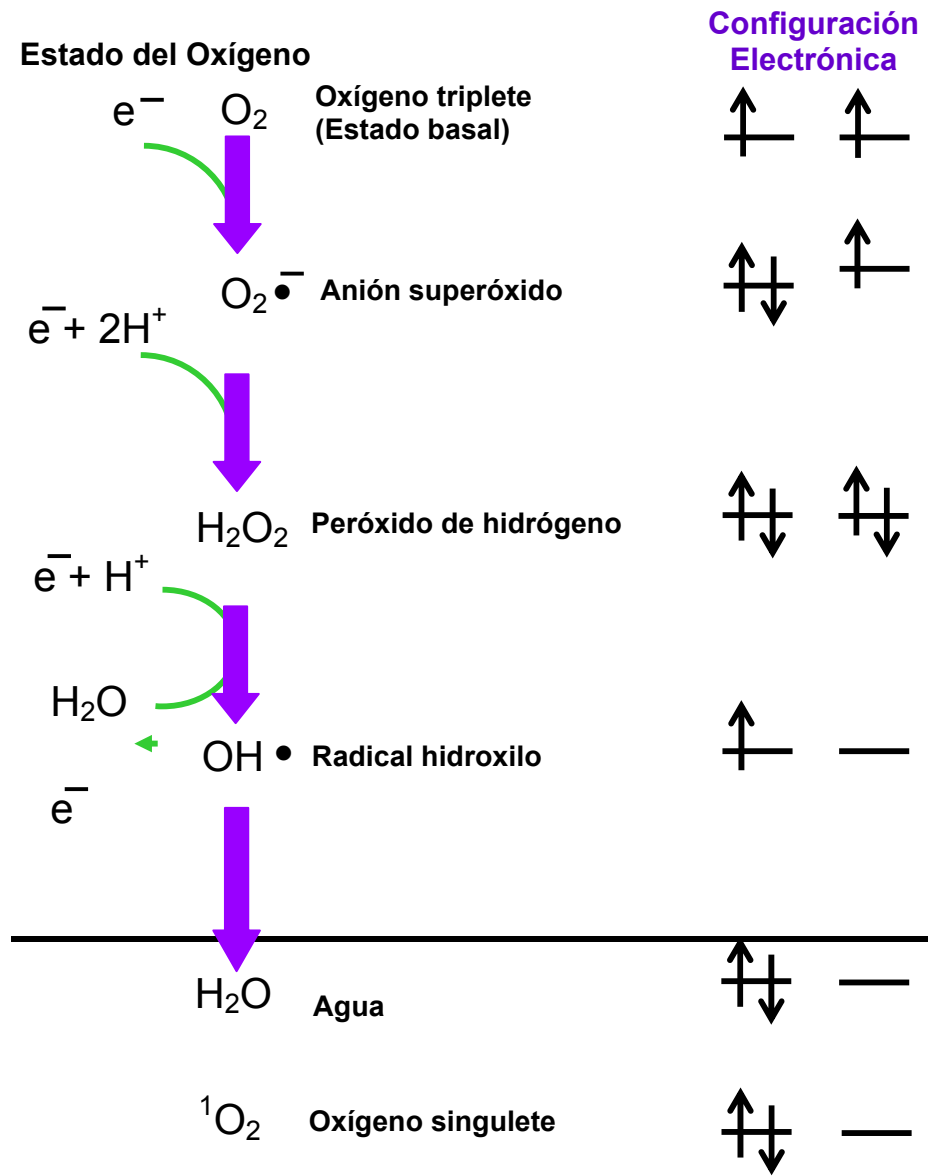
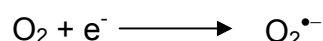


Figura 3. Reducciones sucesivas del oxígeno y formación de especies reactivas del oxígeno.

### 1.1.3 Radical anión superóxido.

El radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) se forma por reducción del  $O_2$  debido a la adición de un electrón a uno de los orbitales p del oxígeno (Gutteridge, 1995; Moldovan y Moldovan, 2004):



La reacción anterior involucra a las enzimas NADPH/NADH oxidasas que se encuentran localizadas en la membrana plasmática (Sánchez-Moreno, 2002); por acción de la xantina oxidasa, que bajo ciertas condiciones de estrés reacciona con donadores de electrones reduciendo al oxígeno y no al  $NAD^+$ , contribuyendo a la formación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) puede actuar como un oxidante o como un agente reductor. El  $O_2^{\bullet-}$  dismuta en  $H_2O_2$ , por tanto, mientras más  $O_2^{\bullet-}$  se produzca mayor cantidad de  $H_2O_2$  se formará (Figura 4).

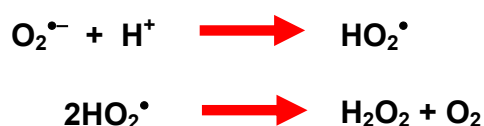


Figura 4. Reacción de dismutación del anión superóxido (Moldovan y Moldovan, 2004).

### 1.1.4 Peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) no presenta electrones no apareados, por tanto, no es una especie radical. La mayoría del  $H_2O_2$  presente en una

célula proviene de la dismutación del radical  $O_2^{\bullet-}$  por acción de enzimas superóxido dismutasas (SOD). Asimismo, la reacción de dismutación del radical anión superóxido genera un radical intermedio denominado radical hidropéroxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ).

Gutteridge (1995) menciona que el peróxido de hidrógeno también puede generarse por adición directa de dos electrones al oxígeno molecular ( $O_2$ ) mediante una serie de reacciones catalizadas por ciertas enzimas oxidativas como: urato oxidasa, glucosa oxidasa y D-aminoácido oxidasa. La generación de este radical por acción de la NADPH oxidasa unida a la membrana de fagocitos activados juega un papel importante en la eliminación de varias cepas bacterianas y fúngicas (Sánchez-Moreno, 2002).

El  $H_2O_2$  es un compuesto oxidante débil y relativamente estable que puede atravesar la capa de lípidos de las membranas celulares debido a la ausencia de carga eléctrica de su molécula. El peróxido de hidrógeno puede oxidar directamente metales de transición tales como el  $Fe^{2+}$  a través de la reacción de Fenton (Figura 5) por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno, produciendo así, el radical hidroxilo  $^{\bullet}OH$  (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

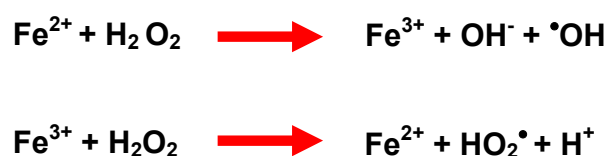


Figura 5. Reacción de Fenton (Gutteridge, 1995).

### 1.1.5 Radical hidroxilo.

El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) es un fuerte agente oxidante (presenta una afinidad sumamente alta por átomos de hidrógeno). Es probablemente, el derivado reactivo del oxígeno más tóxico y más agresivo que se produce (Moldovan y Moldovan, 2004). Tiene una vida media que no rebasa el intervalo de microsegundos debido a que reacciona indiscriminadamente en el lugar o cerca de donde se ha formado con cualquier tipo de biomolécula presente. Durante los últimos años se ha asumido que  $\cdot\text{OH}$  es el radical responsable de iniciar la destrucción oxidativa de las biomoléculas (Beckman y Ames, 1998).

### 1.1.6 Oxígeno singulete.

Los oxígenos singuletes  $^1\Delta_g\text{O}_2$  y  $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$  son formas del oxígeno altamente reactivas, aún cuando no son radicales. Estas especies se forman debido a la absorción de energía de la luz UV (Beckman y Ames, 1998). El oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) se genera cuando los electrones que han sido excitados por la luz pasan su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del  $\text{O}_2$  el cual cambia su giro y se aparea con el otro electrón, lo cual elimina la restricción de espines paralelos no apareados del oxígeno triplete, debido a lo anterior, las formas singuletes del oxígeno presentan una capacidad oxidante mayor (Gutteridge, 1995). El oxígeno singulete puede formarse además, durante la dismutación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en las reacciones de Haber-Weiss y por la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 1.1.7 Ozono.

El ozono ( $O_3$ ) es un gas azul pálido que en la estratósfera funciona como un escudo protector contra la radiación solar (Gutteridge, 1995). Sin embargo, a nivel terrestre el  $O_3$  es un fuerte oxidante fotoquímico y el principal contaminante en el aire en muchas áreas urbanas durante los meses del verano. La magnitud del efecto del ozono generalmente se correlaciona con la concentración de  $O_3$  en las exposiciones. Aunque el ozono no es una especie radical ( $O^{\cdot} O=O$ ) los efectos tóxicos que produce están mediados por reacciones de radicales libres. El  $O_3$  es demasiado reactivo para penetrar profundamente en el tejido, lo que sugiere que el daño celular no es consecuencia del ozono tal cual, sino de una cascada secundaria de reacciones de radicales libres derivados de los productos de ozonización. Dichas reacciones traen como consecuencia respuestas inflamatorias, que se convierten a su vez, en fuentes de especies radicales que ayudan a mantener la cadena de reacciones oxidativas, las cuales se traducen en daño pulmonar (Servais *et al.*, 2005).

### 1.1.8 Óxido Nítrico.

El óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) es una molécula que presenta un electrón no apareado, por tanto es un radical. Actualmente, el  $NO^{\cdot}$  ha sido reconocido como una molécula de señalización en la mayoría de los organismos, que afecta un intervalo amplio de funciones biológicas. El óxido nítrico reacciona rápidamente con otros radicales libres y con metales de transición. Cuando el  $NO^{\cdot}$  reacciona con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se produce un radical altamente reactivo llamado anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). El exceso de  $ONOO^-$  produce lesión oxidativa y daño pulmonar (Aikio, 2002).

### **1.1.9 Ácido hipocloroso (HOCl).**

El HOCl es un fuerte oxidante formado en el cuerpo por neutrófilos activados. La enzima mieloperoxidasa del citoplasma de fagocitos cataliza la formación de HOCl a partir de iones cloro y peróxido de hidrógeno. Se ha mencionado que el ácido hipocloroso puede formar radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), los cuales atacan a los ácidos grasos poliinsaturados para iniciar la peroxidación lipídica (Gutteridge, 1995).

### **1.2 Producción de especies reactivas del oxígeno y radicales libres en sistemas vivos.**

Existen numerosos sitios de oxidación en el organismo, sin embargo se han reconocido cuatro fuentes endógenas que parecen ser las más importantes en la producción de oxidantes a nivel celular. (a) Transporte de electrones en la mitocondria; como consecuencia del proceso normal de la respiración aerobia, la mitocondria consume oxígeno, reduciéndolo en una serie de pasos hasta la producción de agua. (b) Células fagocíticas, que se encargan de la destrucción de bacterias o bien, de células infectadas con virus, al aplicar una descarga oxidativa de  $\text{NO}\bullet$ ,  $\text{O}_2\bullet^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y HOCl. (c) Metabolismo peroxisomal de ácidos grasos, ya que los peroxisomas al degradar los ácidos grasos y otras moléculas producen  $\text{H}_2\text{O}_2$  como subproducto, el cual es transformado posteriormente por la catalasa. (d) Reacciones del citocromo P-450, la inducción de las enzimas del citocromo P-450 en los animales previene efectos tóxicos de químicos externos, pero trae como resultado la aparición de subproductos oxidantes (Ames *et al.*, 1993; Beckman y Ames, 1998).

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno se tienen los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales (Venereo, 2002).

Los radicales libres más importantes en muchas enfermedades son los derivados del oxígeno, particularmente el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ). La formación de radicales en el cuerpo ocurre mediante varios mecanismos que involucran factores endógenos y ambientales. Aún cuando la formación de radicales libres ocurre como consecuencia de las reacciones endógenas mencionadas anteriormente, es importante recordar que los factores ambientales exógenos también promueven la formación de radicales (Figura 6).

La luz ultravioleta favorece la formación de oxígeno singulete y otras especies reactivas en la piel. Los contaminantes atmosféricos contribuyen a la aparición de más especies radicales que merman las defensas antioxidantes en el fluido broncoalveolar (Young y Woodside, 2001). Bräuner *et al.* (2007) mencionan que las partículas ultrafinas (UFP, por sus siglas en inglés) provenientes principalmente de los vehículos diesel causan estrés oxidativo sistémico a los niveles de exposición encontrados en las calles y cerca de los caminos transitados.



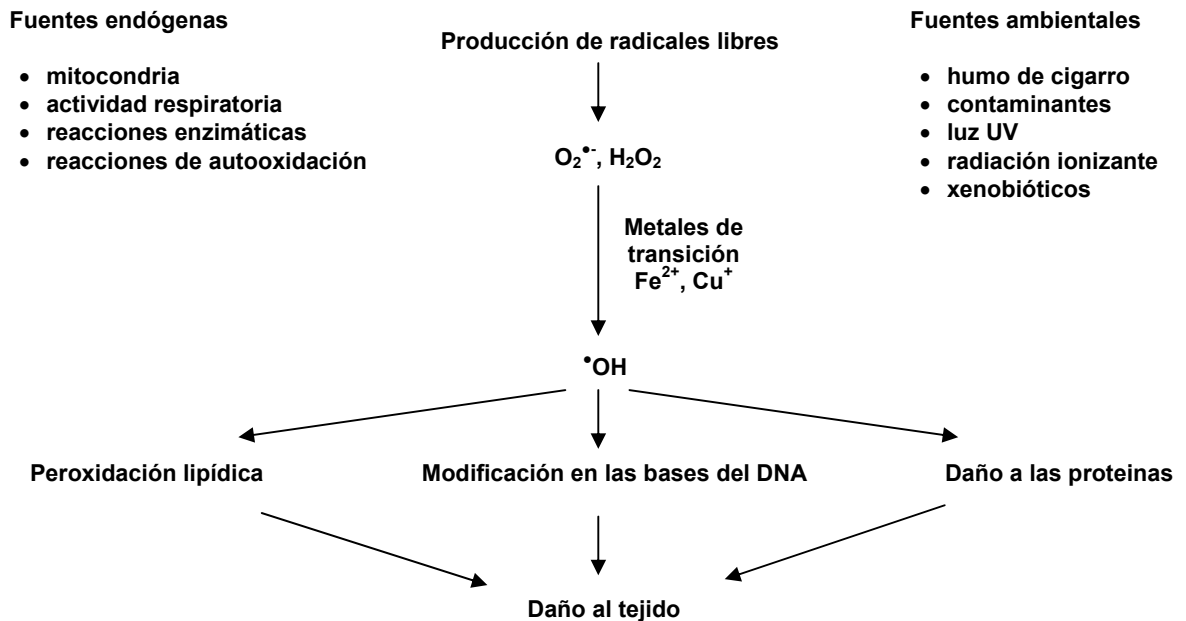


Figura 6. Principales fuentes de radicales libres en el cuerpo y las consecuencias del daño por radicales libres (Young y Woodside, 2001).

El humo del tabaco es una mezcla compleja de compuestos químicos, que incluyen concentraciones elevadas de agentes oxidantes, capaces de interactuar con los constituyentes celulares. El óxido nítrico está presente en el humo de cigarro y reacciona rápidamente hasta formar peroxinitrito y alquil peroxinitritos. Los radicales de vida corta presentes en la fase gaseosa del humo de cigarro pueden ser inactivados inmediatamente en el fluido de la pared epitelial, mientras que las reacciones redox del condensado de humo de cigarro pueden producir especies reactivas del oxígeno por un periodo considerable. El humo de tabaco activa células inflamatorias (especialmente neutrófilos), dichas células incrementan la cantidad de oxidantes en las vías respiratorias (Nagorni-Obradović *et al.*, 2006).

Varios xenobióticos como el paraquat, diquat, paracetamol, bleomicina, alloxano, antraciclinas, entre otros pueden producir daño debido a la formación de radicales libres (Young y Woodside, 2001; Venereo, 2002).

Otras circunstancias en las que también se producen radicales libres se pueden observar en la Figura 7 (Venereo, 2002). Sin duda alguna, es importante mantener un equilibrio en las concentraciones de especies reactivas del oxígeno, de lo contrario se producirá daño celular y tisular (Matsingou *et al.*, 2000).

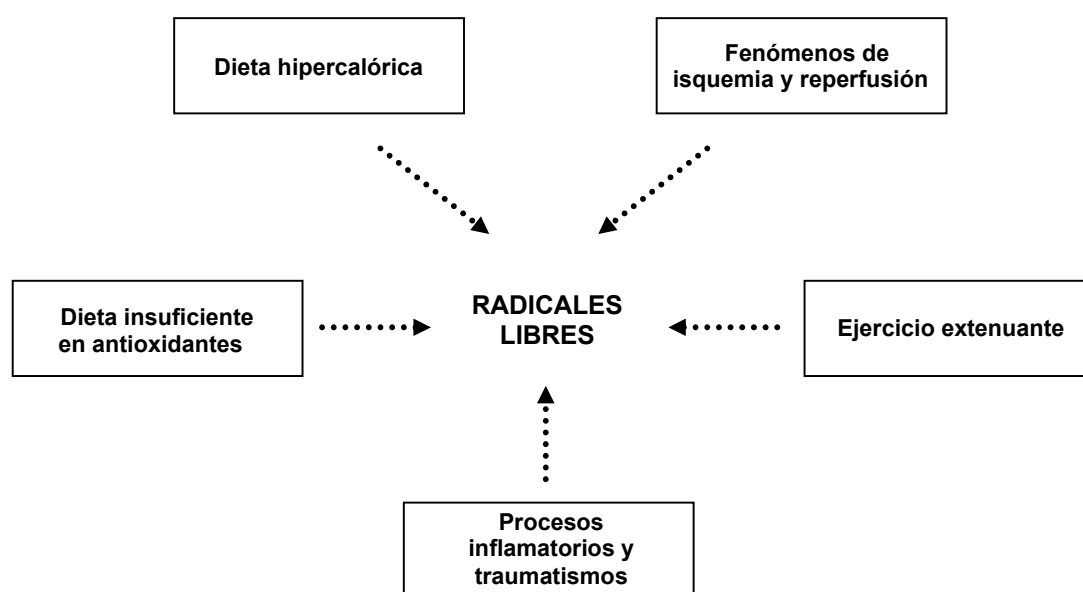


Figura 7. Ejemplos de algunas circunstancias que incrementan las concentraciones de radicales libres en las células.

### 1.3 Estrés oxidativo y daño celular.

Se entiende por estrés oxidativo al daño causado a las moléculas por acción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Young y Woodside (2001) señalan que el estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes; Nagorni-Obradović *et al.* (2006) mencionan que el estrés oxidativo es causado por un incremento en la exposición a oxidantes y una disminución en la habilidad defensiva de los antioxidantes (Figura 8).

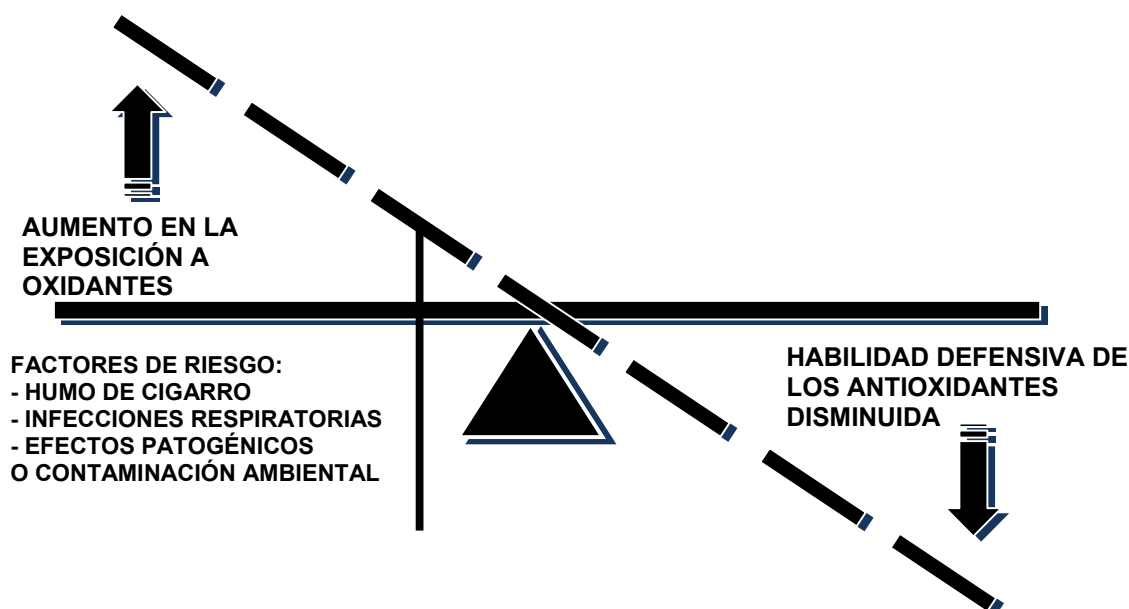


Figura 8. Balance Oxidante-Antioxidante y Estrés oxidativo (Nagorni-Obradović *et al.*, 2006).

Las especies reactivas del oxígeno (Pineda-Alonso *et al.*, 1999) provocan daño celular al interactuar con las macromoléculas (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) presentes en las células (Figura 9).

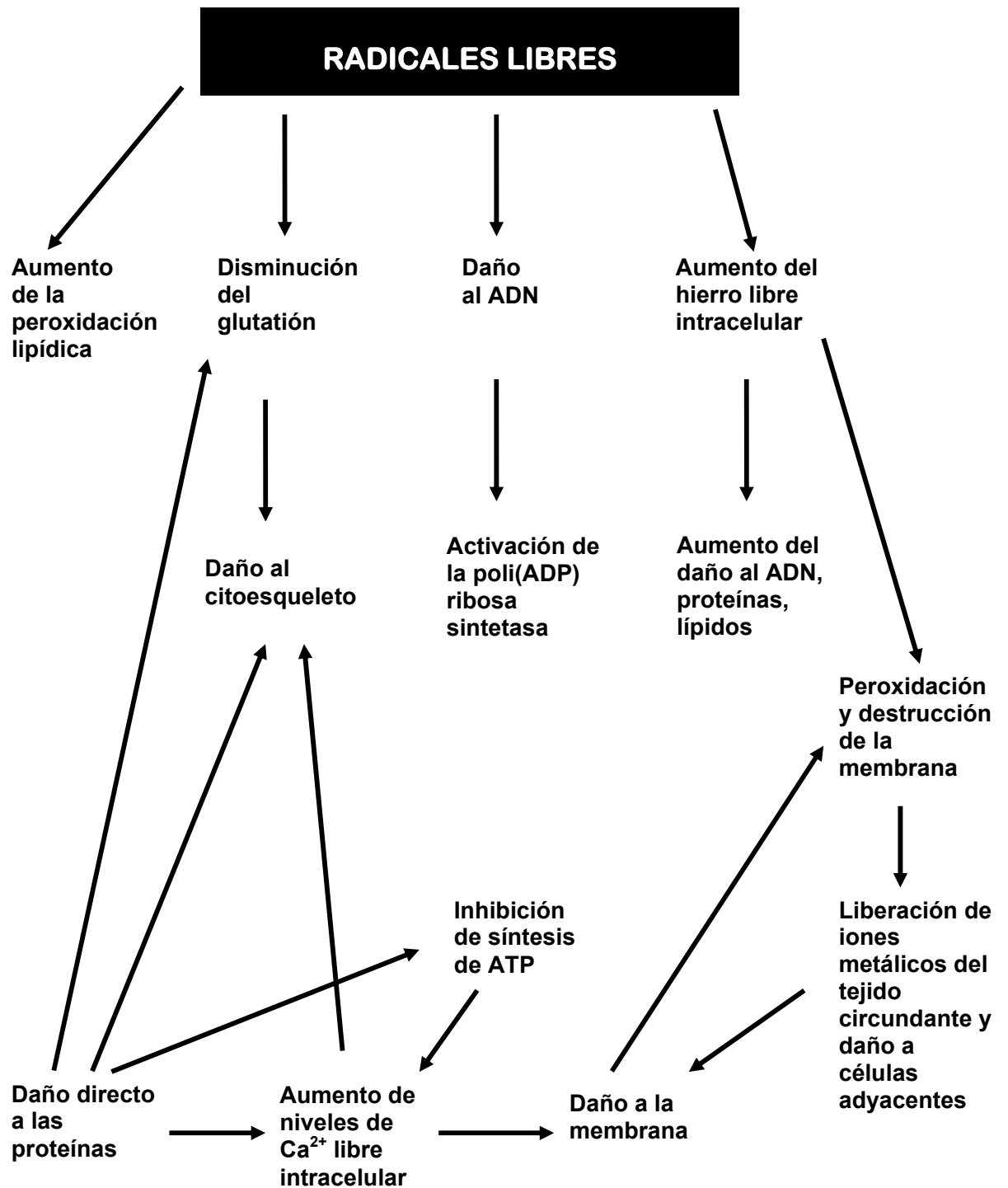


Figura 9. Mecanismos interactivos de los radicales libres que causan daño celular (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

La peroxidación lipídica es provocada por el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el anión superóxido, este último, rompe los lípidos de la membrana plasmática provocando alteraciones que modifican su permeabilidad, lo que resulta en edema y muerte celular (Jerlick *et al.*, 2000). El estrés oxidativo es determinado en el cuerpo midiendo la peroxidación lipídica (Nälsen *et al.*, 2006), de hecho, es la evidencia citada con más frecuencia para sustentar el efecto de las reacciones de radicales libres en una enfermedad (Gutteridge, 1995).

Por otro lado, las proteínas sufren procesos oxidativos en aminoácidos como la fenilalanina, tirosina, histidina y metionina (Venereo, 2002). El ataque de los oxidantes a las proteínas provoca cambios conformacionales, así como, daños a los aminoácidos terminales. Los radicales peroxil proteína son transformados a hidroperóxidos vía abstracción de hidrógeno.

La oxidación de azúcares y polisacáridos por acción de radicales se lleva a cabo típicamente por abstracción de átomos hidrógeno (H) de múltiples sitios (Burkitt, 2004).

Los ácidos nucleicos son biomoléculas especialmente sensibles que pueden sufrir hidroxilación de bases nitrogenadas y rompimiento de hebras al interactuar con especies reactivas del oxígeno, dando lugar a mutaciones, carcinogénesis, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, etcétera (Cadet *et al.*, 1997). Halliwell (2007) menciona que se debe prestar atención al daño oxidativo directo causado a las cadenas de ADN por especies reactivas como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).

La exposición controlada a las partículas ultrafinas del aire está asociada a la oxidación de guaninas en el ADN (Braüner *et al.*, 2007).

El daño a las células provocado por la acción de los radicales libres sobre las biomoléculas ha favorecido la aparición de diversas enfermedades como: varios tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el mal de Parkinson, envejecimiento prematuro, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, etcétera.

Existen múltiples líneas de investigación tanto a nivel laboratorio, como a nivel clínico, que evidencian que el estrés oxidativo causado por las especies reactivas del oxígeno juega un papel importante en la carcinogénesis. Las enzimas celulares, las proteínas estructurales y membranas, azúcares simples y complejos, así como el ADN y el ARN son susceptibles de daño oxidativo que conlleva a la aparición de tumores y cáncer (Lee y Lee, 2006).

Nishino *et al.* (2004) mencionan que el tratamiento con peroxinitrito (un metabolito activo del NO<sup>\*</sup>) trae como consecuencia la formación de tumores cancerígenos en piel de ratones. Por otro lado, se ha reportado que los pacientes con tumores malignos presentan una formación mayor de productos de peroxidación de lípidos en el plasma en comparación con los pacientes con tumores benignos. Khanzode *et al.* (2004) señalan que el aumento de malonaldehído (MDA) en los niveles séricos de pacientes con cáncer de mama es significativamente mayor. A la vez, el aumento de MDA en los niveles séricos de pacientes con cáncer en todas las etapas de la enfermedad incrementa el estrés oxidativo (Hristozov *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo crónico es una de las características consistentes e iniciales de la enfermedad de Alzheimer, por tanto, puede desempeñar un papel central en la cascada de neurodegeneración (De la Monte y Wands, 2006). La evidencia sugiere que la disfunción mitocondrial puede ser la causa central en el aumento del estrés oxidativo en el Alzheimer (Zhu *et al.*, 2006), dicha disfunción puede estar

mediada por un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno, los cuales bloquean el transporte de electrones, disminuyendo el consumo de oxígeno y la producción de ATP (De la Monte y Wands, 2006). De manera similar, en el caso de la enfermedad de Parkinson la disfunción mitocondrial en el complejo-I de la cadena respiratoria puede contribuir a la degeneración neuronal debido a una disminución en la síntesis de ATP, así mismo, se produce daño por un exceso en la producción de especies reactivas del oxígeno (Moore *et al.*, 2005). Un excesivo estrés oxidativo y nitrosativo puede resultar en la disfunción del Sistema Proteosoma-Ubiquitina (UPS), lo cual, contribuye con la acumulación anormal de proteínas y con el fallecimiento dopaminérgico neuronal en la enfermedad de Parkinson esporádica (Gu *et al.*, 2005).

Al igual que en los casos anteriores, el estrés oxidativo ha sido reconocido como un mecanismo clave en el desarrollo del daño vascular, particularmente de arterioesclerosis (Minuz *et al.*, 2006). Por otro lado, Kocić *et al.* (2007) mencionan que el desbalance entre el aumento de los radicales libres inducidos por modificación oxidativa en lípidos y proteínas junto con la disminución de las defensas antioxidantes en el plasma y las células puede agravar la resistencia a la insulina y disminuir la respuesta secretora de insulina en sujetos obesos.

El efecto del estrés oxidativo sobre las células y los tejidos se ha traducido además en la aparición de envejecimiento (Ames *et al.*, 1993), diabetes, hipertensión, etcétera (Demissie *et al.*, 2006).

Sin embargo, se ha observado que el consumo abundante de antioxidantes puede ayudar a mantener una buena salud y vitalidad al ganar edad reduciendo la posibilidad de contraer enfermedades de riesgo relacionadas con el envejecimiento (Schofield, 2007).

## **1.4 Antioxidantes.**

El término “antioxidante” es cada vez más popular en la sociedad moderna a medida que gana publicidad a través de la cobertura que los medios masivos de comunicación llevan a cabo acerca de sus efectos benéficos a la salud (Huang *et al.*, 2005). Durante los últimos años los antioxidantes se presentan como compuestos de gran interés sometidos a un gran número de estudios en áreas como la Biotecnología y la Medicina, debido a que protegen al cuerpo humano al contrarrestar el daño provocado en el tejido animal por acción de las especies reactivas del oxígeno. Es debido a lo anterior, que se han lanzado al mercado un gran número de suplementos alimenticios que contienen antioxidantes sintéticos o naturales, los cuales se ofrecen al consumidor para cumplir con un propósito en una condición específica. Por ejemplo, luteína para la visión, licopeno para la salud de la próstata y el corazón, sulforafano como protección contra la carcinogénesis y la vitamina C para fortalecer el sistema inmune. Los tres beneficios principales que los consumidores asocian con el consumo de antioxidantes son: (a) prevención de varios tipos de cáncer, (b) mantenimiento del sistema inmune y (c) salud del corazón (Schofield, 2007).

### **1.4.1 Definición.**

Halliwell *et al.* (1995) definen a un antioxidante como: “cualquier sustancia que estando presente en concentraciones bajas comparada con un sustrato oxidable, significativamente retarda o previene la oxidación de dicho sustrato”. Otra definición menciona que un antioxidante es “una sustancia que se opone o inhibe las reacciones de oxidación promovidas por el oxígeno y los peróxidos, muchas de estas sustancias han sido utilizadas como conservadores en varios productos como: grasas, aceites, productos alimenticios y jabones para retardar el proceso de rancidez, en la gasolina y otros derivados del petróleo para retardar la formación de goma y otros



cambios no deseados, así como en las ligas para retardar su envejecimiento”. Una definición biológica más precisa señala que los antioxidantes son “sustancias sintéticas o naturales adicionadas a los productos para prevenir o retardar su deterioro por acción del oxígeno en el aire”. En Medicina y Bioquímica los antioxidantes son enzimas u otras sustancias orgánicas capaces de contrarrestar el efecto dañino de la oxidación en los tejidos animales (Huang *et al.*, 2005).

Los antioxidantes pueden ser nutrimentos exógenos como: vitaminas, minerales y fitoquímicos o enzimas endógenas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) que intervienen en las reacciones de oxidación. La importancia de dichos antioxidantes depende de la especie reactiva sobre la que actúan, dónde y cómo se genera el radical, así como del daño que produce a la célula.

#### **1.4.2 Fuentes de antioxidantes exógenos.**

Las frutas y los vegetales en general, además de aportar azúcares, grasas, proteínas, vitaminas, minerales y fibras, son excelentes fuentes de muchos tipos de antioxidantes como la vitamina C, vitamina E, flavonoides, carotenoides, polifenoles, etcétera (Cano y Arnao, 2004).

El ácido L-ascórbico o vitamina C es una vitamina soluble esencial que al ser consumida se distribuye rápidamente por todos los tejidos. El ascorbato se encarga de modular las reacciones redox del hierro reduciendo las especies  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Como un antioxidante *in vivo*, la vitamina C se encarga de: (a) neutralizar al anión superóxido, al radical hidroxilo, al radical peroxilo, al ozono y óxido nítrico, (b) actuar como un poderoso neutralizador de ácido hipocloroso, ácido peroxinitroso, oxígeno singulete y (c) estabilizar a las catecolaminas para la formación de especies reactivas del oxígeno, al

mantener funcionando apropiadamente a la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa. Existe un efecto sinérgico entre la vitamina C y la vitamina E que explica el buen funcionamiento del ascorbato en cuanto a la protección de los lípidos contra el estrés oxidativo. El ascorbato coopera con la vitamina E al regenerar el  $\alpha$ -tocoferol a partir de radicales  $\alpha$ -tocoferil formados en las membranas y en las lipoproteínas.

Los polifenoles (como el ácido gálico y el ácido ferúlico, entre otros) son compuestos de bajo peso molecular que no pueden ser sintetizados en los humanos. Se han detectado en plantas, nueces, semillas, flores, especias, té, vino tinto, frutas, vegetales, etcétera. En las plantas se encuentran generalmente como derivados glucosilados o sulfatados y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis catalizando el transporte de electrones. Estos compuestos han sido reconocidos como potentes antioxidantes con propiedades citoprotectoras y antiinflamatorias.

Los polifenoles poseen partes hidrofílicas e hidrofóbicas que les permiten actuar contra las especies reactivas del oxígeno producidas tanto en medio acuoso, como en medio lipídico. Los polifenoles con actividad antioxidante protegen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación. Las propiedades antioxidantes de los polifenoles incluyen: neutralización directa (al actuar como agentes reductores) de  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{ONOOH}$  y  $\text{HOCl}$ ; conservación de la actividad paraoxonasa sérica (PON), favoreciendo la hidrolización de LDL-oxidada (Sagin y Sozmen, 2004).

El mantener una dieta saludable que asegure el mantenimiento óptimo de los niveles de los antioxidantes exógenos en las células reduce el riesgo de sufrir daño tisular, es por este motivo que se promueve la ingesta diaria de cinco porciones de vegetales y frutas.

Diversas investigaciones han reportado que los antioxidantes naturales, como el beta caroteno, muestran una actividad antioxidante mayor comparados con sus formas sintéticas, debido principalmente, a las diferencias en sus estructuras químicas. La potencia de una forma de caroteno sobre otra se ejemplifica con el caso del alfa caroteno, el cual presenta un potencial antioxidante mayor, en comparación con el beta caroteno, debido a que muestra una elevada actividad biológica al neutralizar a los radicales libres asociados al daño peroxidativo de las membranas celulares. Ocurre lo mismo con la vitamina E, cuya forma natural es dos veces más activa biológicamente que su contraparte sintética (Schofield, 2007).

En el Cuadro I se muestran algunas de las fuentes principales de antioxidantes exógenos.

Cuadro I. Antioxidantes exógenos de importancia en la dieta y sus fuentes.

<b>Antioxidante</b>	<b>Fuente</b>
Vitamina E	Aceites vegetales, aguacate, semillas, almendras, cacahuates, nueces, germen de trigo, vegetales de hojas verdes.
Vitamina C	Naranja, toronja, mandarina, guayaba, manzana, fresas, brócoli, vegetales de hojas verdes, papas, tomates.
Selenio, Zinc, Magnesio	Carne de res, cerdo, pollo, mariscos, arroz.
Carotenoides	Zanahoria, sandía, tomates, espinacas, mango, calabaza, papaya, col, acelga.
Flavonoides	Uvas, moras, cerezas, manzanas, toronjas, arándanos, moras, frambuesas, chocolate, té, cebolla, canela, cacahuate.
Isotiocinatos	Brócoli, col, coles de bruselas, repollo, rábano.
Fenoles, polifenoles	Moras, cerezas, arándanos, moras azules, frambuesas, té, canela, pera, manzanas, toronja, vinos.

Gorinstein *et al.* (2002) y Leontowicz *et al.* (2003) mencionan que las cáscaras de manzana y pera muestran alto contenido de polifenoles que actúan como compuestos antioxidantes en el plasma de ratones.

Las proantocianidinas de semilla de uva son potentes neutralizadores de radicales libres que brindan una protección significativa contra el estrés oxidativo, de hecho estos compuestos muestran efectos antidiabéticos al preservar la función de las células pancreáticas  $\beta$  (El-Alfy *et al.*, 2005).

Además de las frutas convencionales, frutos exóticos como el kiwi (Park *et al.*, 2006), el p $\acute{e}$ rsimo (Park *et al.*, 2006), el mangostán y la fruta serpiente muestran grandes cantidades de polifenoles y un potencial antioxidante mucho mayor que las hace una fuente más rica en antioxidantes comparadas con otras frutas tropicales (Leontowicz *et al.*, 2007). Otros alimentos como los cereales y pseudocereales (Yu *et al.*, 2002; Gorinstein *et al.*, 2007), la carne, frutos secos como el d $\acute{a}$ til y el higo (Vinson *et al.*, 2005) y ciertas bebidas (cerveza, vino), poseen compuestos con una elevada capacidad antioxidante.

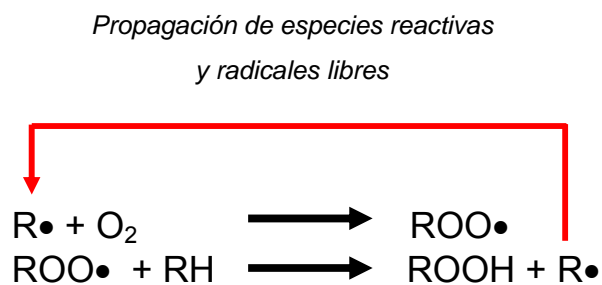
Es importante entender que los antioxidante presentan propiedades únicas (relacionadas con sus estructuras químicas) que los hacen funcionar mejor en diferentes partes de la célula. La vitamina C, por ejemplo, es más efectiva en el citosol (parte acuosa de célula), mientras que la vitamina E (tocotrienol) es más potente en la membrana y en la mitocondria (parte lipofílica) de la célula (Schofield, 2007).

### 1.4.3 Mecanismo de acción de los antioxidantes.

Somogyi *et al.* (2007) mencionan que los antioxidantes endógenos (sintetizados internamente) o exógenos (consumidos) pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo a su mecanismo de acción.

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa combatiendo a los radicales libres mediante dos mecanismos:

- a) *Rompimiento de la cadena de formación de radicales libres:*** se presenta cuando los antioxidantes impiden que otra molécula se una al oxígeno (deteniendo o retardando la cadena de producción de radicales libres altamente inestables), al reaccionar más rápido con los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno que con otras moléculas (Figura 10). Un buen antioxidante (AH) debe reaccionar rápidamente con los radicales, por otro lado, el radical antioxidante formado ( $A^{\bullet}$ ) no debe reaccionar, o bien, reaccionar muy lentamente con otra molécula sustrato (RH). En la presencia de antioxidantes, la acumulación de peróxido lipídico debería ser mínima hasta que todos los antioxidantes hayan sido sacrificados (Huang *et al.*, 2005).



*Rompimiento de la cadena de propagación de  
radicales libres por acción del antioxidante AH*

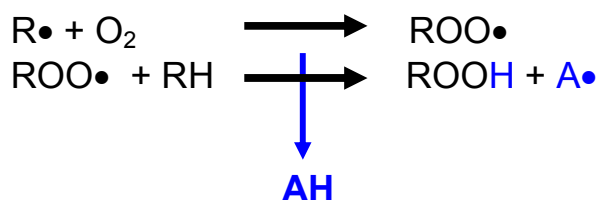


Figura 10. Rompimiento de la cadena de formación de radicales libres.

**b) Prevención de la formación de radicales:** diversas enzimas con capacidad antioxidante como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa disminuyen el grado de iniciación de la cadena de formación de radicales libres al inactivar o eliminar los radicales iniciadores, de manera que las enzimas antioxidantes previenen que la cadena de formación de radicales se lleve a cabo, manteniendo un equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de éstos últimos. A su vez, previenen la oxidación al estabilizar iones de metales como el hierro y el cobre (Figura 11). La enzima catalasa lleva a cabo la conversión de peróxido de hidrogeno a oxígeno y agua, por otro lado, la glutatión peroxidasa cataliza la oxidación de glutatión a expensas de hidroperóxidos (peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos). Finalmente, la superóxido dismutasa cataliza la dismutación del radical

superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual es removido por la catalasa y la glutatión peroxidasa (Young y Woodside, 2001). Otros antioxidantes preventivos son proteínas que unen metales de transición como: la albúmina, metalotionina, transferrina, ceruloplasmina, mioglobina y ferritina, las cuales unen especies reactivas del oxígeno y otras moléculas, protegiendo a las proteínas esenciales (Somogyi *et al.*, 2007).

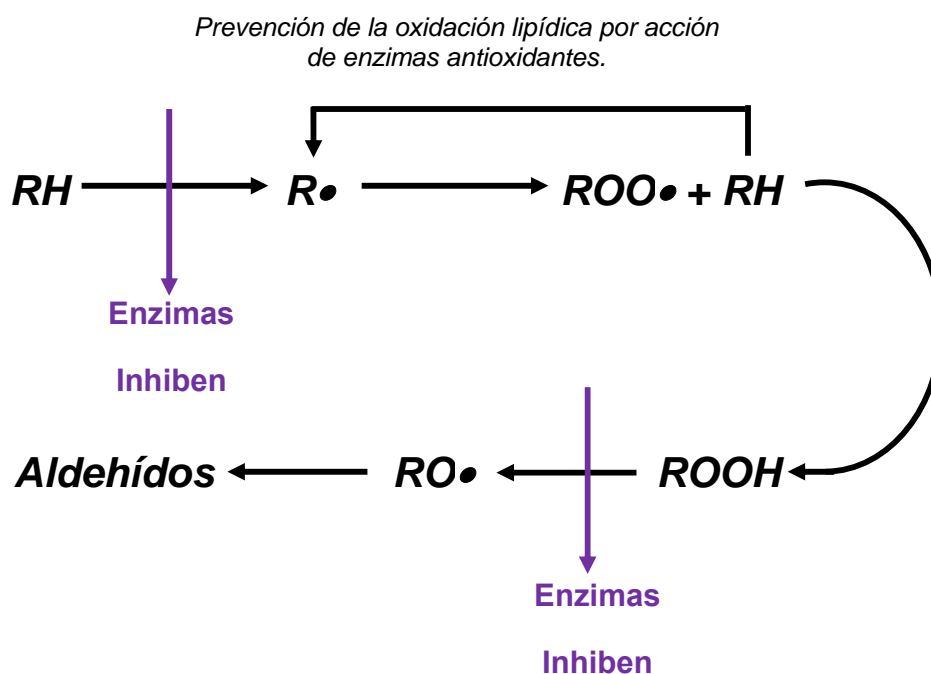


Figura 11. Mecanismo de acción de antioxidantes para prevenir formación de radicales libres.

A pesar de que los antioxidantes actúan impidiendo la formación de radicales libres tanto en medios hidrofílicos (compartimientos citosólicos, mitocondriales y nucleares) como en medios hidrofóbicos, es decir, en las membranas celulares donde previenen o inhiben las reacciones de peroxidación lipídica (Somogyi *et al.*, 2007), bajo ciertas circunstancias

algunos antioxidantes pueden actuar en forma inversa, es decir, como sustancias prooxidantes que paradójicamente ayudan a que se produzca un mayor daño oxidativo (Young y Woodside, 2001), al favorecer la producción de especies reactivas del oxígeno sumamente tóxicas.

El  $\beta$ -caroteno a bajas concentraciones de oxígeno actúa como un antioxidante que rompe la cadena de formación de radicales libres, sin embargo, si las concentraciones de oxígeno son elevadas, se autooxida y exhibe un comportamiento prooxidante (Burton e Ingold, 1984).

### **1.5 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante.**

Huang *et al.* (2005) señalaron que el número de publicaciones sobre antioxidantes y estrés oxidativo es casi cuatro veces mayor actualmente que en la década pasada (1684 publicaciones en 1993 y 6510 en 2003). Para el público en general, los nutriólogos y médicos expertos, así como, para los investigadores en salud y ciencia de los alimentos resulta de gran interés conocer la capacidad antioxidante y los constituyentes de los alimentos que consumimos. Es por lo anterior que en los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias, debido a los efectos benéficos que los antioxidantes aportan a las células al estar presentes en los niveles óptimos (Böhm y Schlesier, 2004).

Los métodos para determinar la capacidad antioxidante se dividen en dos grandes grupos: métodos *in vitro* y métodos *in vivo* (incluyen métodos *ex vivo*). Los métodos *in vitro* pueden ser utilizados para establecer si un compuesto determinado es un antioxidante o no. Estos métodos son pruebas colorimétricas simples que no requieren del uso de tejido animal.



La identificación inicial de antioxidantes, los cuales pueden neutralizar varios radicales libres y prevenir múltiples enfermedades, puede llevarse a cabo por pruebas simples *in vitro*. Pero los resultados *in vitro* obtenidos deben ser confirmados posteriormente con pruebas que involucren sistemas *ex vivo* e *in vivo* (Kaur y Geetha, 2006).

Böhm y Schlesier (2004) mencionan que los métodos *in vitro* pueden ser divididos en cinco grupos: (a) Métodos para la detección de la peroxidación de los lípidos, (b) Métodos con generación de radicales, (c) Métodos con pruebas fluorimétricas, (d) Métodos de fotoquimioluminiscencia y (e) Métodos electroquímicos. Por otro lado, Huang *et al.* (2005) y MacDonald *et al.* (2006) señalan que en función a las reacciones involucradas, los métodos *in vitro* pueden ser divididos en dos grandes grupos: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos hidrógeno (HAT) y ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones (ET). En el Cuadro II se muestran los métodos HAT y ET más utilizados para determinar la capacidad antioxidante.

Cuadro II. Ensayos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

Ensayos que involucran reacciones de transferencia de átomos hidrógeno	ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno)
$ROO\cdot + AH \longrightarrow ROOH + A\cdot$	TRAP (Parámetro total de atrapamiento de radicales por antioxidantes)
$ROO\cdot + LH \longrightarrow ROOH + L\cdot$	Blanqueamiento de crocina
	IOU (Inhibición del consumo de oxígeno)
	Inhibición de la oxidación de ácido linoléico
	Inhibición de la oxidación de LDL
Ensayos que involucran reacciones de transferencia de electrones	TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox)
$M(n) + e \text{ (de AH)} \longrightarrow$	FRAP (Parámetro antioxidante de la reducción del ion hierro)
$AH^{*+} + M(n-1)$	DPPH (Difenil-1-picrilhidrazil)
	Ensayo de fenoles totales con reactivo de Folin-Ciocalteau
Otros ensayos	TOSC (Capacidad antioxidante total de neutralización)
	Inhibición de la reacción de oscilación de Briggs-Rauscher
	Quimioluminiscencia
	Electroquimioluminiscencia

La mayoría de los ensayos basados en HAT comprenden un esquema de reacción competitiva en el que un antioxidante y un sustrato compiten por radicales peroxilo generados térmicamente por medio de la descomposición de compuestos azo.

Los ensayos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando es reducido. El grado de decoloración se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes en las muestras (Somogyi *et al.*, 2007). A continuación se presentan las características más relevantes de algunos de los métodos desarrollados en los últimos años:

### **1.5.1 Método de inhibición del consumo de oxígeno (IOU).**

Este método utiliza estireno como sustrato y azoisobutirnitrito (AIBN) como el iniciador de formación de radicales. Básicamente consiste en la medición de los niveles de consumo de oxígeno en la presencia y ausencia de tocoferoles en clorobenceno usando un sistema transductor de presión que permita trabajar bajo una atmósfera de presión de oxígeno. Las desventajas que presenta son: (a) no puede ser utilizado ampliamente debido a que los datos experimentales son obtenidos bajo altas presiones de oxígeno, las cuales están alejadas de las condiciones normales; (b) el análisis de muestras de alimentos es difícil, ya que las muestras contienen bajas concentraciones de antioxidantes comparadas con las concentraciones requeridas para el uso de este método y (c) la sensibilidad del método no es suficiente (Huang *et al.*, 2005).

### **1.5.2 Método de inhibición de la autooxidación lipídica.**

El método se basa en inducir la autooxidación de ácido linoleico o proteínas de baja densidad (LDL) utilizando Cu(II) o un iniciador azo, midiendo el progreso de la autooxidación a una absorbancia de 234 nm para detectar la formación de óxidos conjugados de dieno. En presencia del iniciador de radicales 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH), la reacción comienza y los óxidos conjugados de dieno se acumulan rápidamente. Cuando se adiciona un antioxidante (tocoferoles) la reacción se hace más lenta hasta que el antioxidante se consume (Huang *et al.*, 2005).

Este método es más sensible que el IOU y utiliza 10 veces menos sustrato e iniciador. Los problemas que presenta este método son: (a) resulta difícil medir tiempos lag pequeños y (b) muchas sustancias presentes en los

alimentos absorben a 234 nm (MacDonald *et al.*, 2006). Además se ha encontrado que el Cu(II) por sí solo no induce la autoxidación de los lípidos, en su lugar, la reacción de autoxidación de LDL es iniciada por radicales libres formados a partir de los antioxidantes (tocoferoles) por donación de electrones al Cu(II) (Huang *et al.*, 2005).

### **1.5.3 Método de evaluación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

Método usado comúnmente para detectar la peroxidación de los lípidos. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico son dialdehídos producidos por acción de los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno durante la oxidación de las grasas. La reacción de la peroxidación de lípidos da lugar a la formación de malonaldehído, el cual reacciona con el ácido tiobarbitúrico formando TBARS que son extraídas con n-butanol (Kaur y Geetha, 2006), dichas reacciones dan lugar a la aparición de un pigmento rosa que presenta un máximo de absorbencia a 532 nm (Böhm y Schlesier, 2004).

Con este método se pueden presentar interferencias en las mediciones si previamente no se lleva a cabo una separación por cromatografía líquida del complejo, debido a que el ácido tiobarbitúrico puede reaccionar con otras sustancias como: urea, sacarosa, proteínas y otros alcaloides, formando especies que presentan un color característico. Además en países como México, la ley prohíbe el uso de sustancias barbitúricas, por tanto, no se puede adquirir el ácido tiobarbitúrico, el cual es un reactivo indispensable para la prueba. Este método se ha empleado para analizar la actividad antioxidante de los constituyentes del jengibre (Kikuzaki y Nakataki, 1993), así como, en productos cárnicos.

#### **1.5.4 Método de la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).**

El primer método ORAC empleaba una proteína fluorescente llamada B-ficoeritrina (B-PE). La disminución en la fluorescencia de la B-PE indicaba el daño producido al reaccionar con el radical peroxilo (Huang *et al.*, 2005). La fluorescencia era medida cada cinco minutos, usando una solución de Trolox (análogo soluble de la vitamina E) como estándar. El valor ORAC se consideraba como el área neta de protección bajo la curva de inactivación de B-PE en presencia de un antioxidante (Böhm y Schlesier, 2004). Sin embargo, se observó que la B-PE sufría fotoblanqueamiento y que interactuaba con polifenoles perdiendo fluorescencia aún cuando no se adicionara un generador de radicales (MacDonald *et al.*, 2006).

Las versiones mejoradas de ORAC emplean fluoresceína en lugar de B-PE, lo cual permite obtener mediciones directas de la capacidad antioxidante de antioxidantes hidrofílicos contra radicales peroxilo (Böhm y Schlesier, 2004). La fluoresceína eliminaba los problemas que se presentaban con la B-PE, pero resultó ser sensible al pH (MacDonald *et al.*, 2006) y no era lo suficientemente soluble en lípidos, mostrando una menor intensidad en la fluorescencia al estar presente en solventes orgánicos no polares (Huang *et al.*, 2005). Otra de las desventajas del método ORAC es que se requiere de un detector de fluorescencia (Cao y Prior, 1998), es decir, un analizador FARA COBAS II el cuál no se encuentra fácilmente disponible (MacDonald *et al.*, 2006).

Por otro lado el método HORAC (Hidroxy radical averting capacity) aparece como un complemento de ORAC. El método HORAC permite analizar la capacidad de prevención del radical hidroxilo, los radicales hidroxilo son generados en presencia de iones de metales oxidables como Co(II) y peróxido de hidrógeno (Böhm y Schlesier, 2004).

El método ORAC se ha utilizado ampliamente para determinar la capacidad antioxidante de frutas, vegetales, nueces, frutas secas, especias, alimentos obtenidos de granos, jugos, alimento para bebés, papas fritas, cátsup, crema de maní, etcétera (Wu *et al.*, 2004); capacidad antioxidante del plasma humano (Cao y Prior, 1998), entre otros.

### 1.5.5 Blanqueamiento de crocina.

La crocina es un compuesto natural que muestra una absorbencia extremadamente fuerte en el intervalo de absorción visible (Roginsky y Lissi, 2005). Este método se basa en la medición del blanqueamiento del carotenoide crocina a 450 nm en microplatos, por acción de los radicales peroxilo (ROO<sup>•</sup>) generados durante la descomposición térmica del iniciador AAPH. En la Figura 12 se puede observar la estructura del compuesto iniciador.

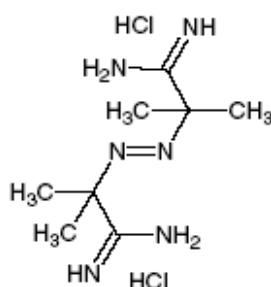


Figura 12. Estructura molecular del 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH).

La inhibición del blanqueamiento es función del poder antioxidante de las sustancias adicionadas a la mezcla de incubación (Somogyi *et al.*, 2007).

El método de blanqueamiento de crocina tiene aplicaciones limitadas en muestras de alimentos. Los niveles de reacción entre ROO<sup>•</sup> y fitoquímicos

pueden variar considerablemente, muchos de éstos no muestran fase lag, mientras que otros si (Huang *et al.*, 2005).

### **1.5.6 Blanqueamiento de $\beta$ -caroteno.**

Kaur y Geetha (2006) mencionaron que el ensayo antioxidante usando la decoloración de  $\beta$ -caroteno se utiliza frecuentemente, debido a que el beta caroteno es extremadamente susceptible a la oxidación mediada por radicales libres. Esta prueba está basada en el blanqueamiento competitivo del  $\beta$ -caroteno durante la autooxidación del ácido linoléico en emulsiones acuosas; el blanqueamiento se monitorea como una disminución en la absorbencia en la región visible. La adición de una muestra que contiene antioxidantes, antioxidantes individuales o extractos naturales provoca que la disminución de beta caroteno se retarde. Se ha mencionado que el sistema  $\beta$ -caroteno se oxidada bajo condiciones no controladas, lo cual hace difícil la obtención de datos reproducibles (Roginsky y Lissi, 2005).

### **1.5.7 Método del parámetro total del atrapamiento de radicales por antioxidantes (TRAP).**

Huang *et al.* (2005) señalan que la prueba TRAP emplea R-ficoeritrina (R-PE) como prueba fluorescente. El progreso de la reacción de la R-PE con AAPH se monitorea fluorimétricamente ( $\lambda_{cx} = 495$  nm y  $\lambda_{cm} = 575$  nm) hasta que el nivel de disminución de la fluorescencia se restablece al nivel obtenido antes de la adición de Trolox. La fase lag se calcula extrapolando las curvas de oxidación máxima de R-PE antes y después de la adición de Trolox.

Böhm y Schlesier (2004) mencionan que el valor TRAP se define como el número de moles de radicales peroxilo atrapados por litro de fluido, el cual es calculado usando Trolox como estándar con un factor

estequiométrico de 2 (dos radicales peroxilo atrapados por molécula de Trolox). Una de las desventajas de este método es que no todas las muestras permiten observar una fase lag.

#### **1.5.8 Método de Folin-Ciocalteu (F-C) para la cuantificación de polifenoles.**

Durante muchos años la prueba de F-C se ha utilizado para medir los polifenoles totales de productos naturales, sin embargo el mecanismo básico de reacción es una oxidación/reducción, por tanto, puede ser considerada como un método para evaluar la capacidad antioxidante (Prior *et al.*, 2005). La prueba de F-C mide la capacidad reductora de una muestra (Huang *et al.*, 2005). El ensayo de F-C es simple, reproducible y conveniente y puede aplicarse para analizar antioxidantes fenólicos (MacDonald *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) bajo condiciones alcalinas, en las que la disociación del protón fenólico, produce un anión fenolato capaz de reducir al FCR (MacDonald *et al.*, 2006), que se detecta a una  $\lambda_{\max}$  de 765 nm.

Algunas de las desventajas de este ensayo son: bajo condiciones ácidas, la reacción es lenta y carece de especificidad (Prior *et al.*, 2005); el reactivo de Folin no es específico para compuestos fenólicos y puede ser reducido por otros compuestos como el Cu (I) y la vitamina C (Huang *et al.*, 2005).



### 1.5.9 Método de evaluación de la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) o Método ABTS.

El método que emplea al compuesto 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS (Figura 13), es uno de los métodos espectrofotométricos más utilizado para determinar la capacidad antioxidante *in vitro*.

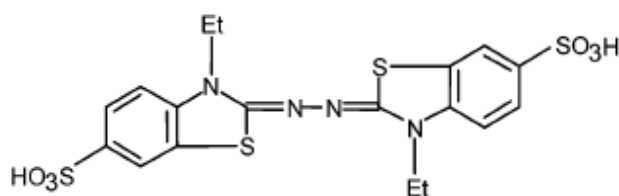


Figura 13. Estructura del 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS (Prior *et al.*, 2005).

El método original (Miller *et al.*, 1993) emplea la actividad peroxidasa de la metmioglobina para oxidar al ABTS en presencia de peróxido de hidrógeno. El proceso de oxidación forma el radical catión  $ABTS^{\bullet+}$  con absorción máxima de 650, 734 y 820 nm. En presencia de antioxidantes reductores y donadores de hidrógenos la reacción se detiene y la absorbencia del  $ABTS^{\bullet+}$  disminuye, relacionando así la capacidad antioxidante de la muestra (Böhm y Schlesier, 2004).

En una versión mejorada, el  $ABTS^{\bullet+}$  es generado por oxidación de ABTS con persulfato. Para obtener la solución de  $ABTS^{\bullet+}$ , se disuelven 7 mmol de ABTS en agua y se tratan con 2.45 mmol de persulfato de potasio, la mezcla obtenida se mantiene a temperatura ambiente por aproximadamente 12-16 horas hasta obtener una solución azul oscuro

intensa. Esta solución se diluye con etanol o amortiguador pH 7.4 hasta que la absorbencia alcance un valor de 0.7 a 734 nm. Posteriormente, se mezcla un mililitro de la solución con 10  $\mu$ L de la muestra. La absorbencia es medida a 30 °C por 1, 4 y 6 minutos. La diferencia de la lectura en absorbencia se grafica contra la concentración de antioxidante hasta obtener una línea recta. La concentración de antioxidantes que muestra el mismo porcentaje de cambio en la absorbencia de ABTS<sup>•+</sup> de 1 mM de Trolox se considera como TEAC.

Debido a su simplicidad operacional, el método TEAC ha sido utilizado en muchos laboratorios de investigación para estudiar la capacidad antioxidante de compuestos y muestras de alimentos (Huang *et al.*, 2005). Además la prueba TEAC también se ha aplicado para evaluar la capacidad antioxidante total en plasma (Cao y Prior, 1998).

La reacción basada en el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> ha sido comercializada como un kit por Randox Laboratories Ltd. (Somogyi *et al.*, 2007).

Arnao *et al.* (1996) introdujeron modificaciones al ensayo al generar enzimáticamente al radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> usando un sistema formado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidasa de rábano (HRP), nombrando al método: ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP.

La reacción en el sistema se monitorea en un intervalo de longitudes de onda de 400 a 750 nm para evitar interferencias exógenas. Se pueden utilizar dos estrategias para determinar la capacidad antioxidante: (a) los compuestos antioxidantes son adicionados previo a la formación del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> y se mide la fase lag (también conocida como tiempo lag) en la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> producida por los diferentes antioxidantes (ver Apéndice 1) y (b) el radical ABTS<sup>•+</sup> es pre-generado y

cuando se obtiene una absorbencia estable la muestra de antioxidante se adiciona al medio de reacción, de manera que la capacidad antioxidante es medida en términos de decoloración. Debido a que el radical  $ABTS^{\bullet+}$  puede ser disuelto tanto en medio acuoso, como en etanol acidificado, es posible determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de los compuestos (Sánchez-Moreno, 2002).

Ing-Chien *et al.* (2004) reportaron el uso del sistema  $ABTS/H_2O_2/HRP$  en la determinación de la capacidad antioxidante de vegetales y hierbas tradicionales chinas usando un lector de microplatos. Los valores de capacidad antioxidante en ese trabajo se reportan como equivalentes de ácido L-(+)-ascórbico.

#### **1.5.10 Método de la prueba del poder antioxidante de reducción del ion hierro (FRAP).**

El método FRAP es una medición simple de la habilidad reductora de los antioxidantes. A diferencia de otros métodos, la prueba FRAP no utiliza radicales (Böhm y Schlesier, 2004), sino una sal férrica que actúa como oxidante y que se conoce con el nombre de reactivo FRAP. El reactivo FRAP se prepara mezclando 2,4,6- Tripiridil-s-triazina (TPTZ) y cloruro férrico ( $FeCl_3 \cdot H_2O$ ) para obtener  $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$ .

Los valores FRAP de una muestra se obtienen de la siguiente forma: 300  $\mu$ L del reactivo FRAP preparado al momento se calientan a 37 °C y se mide la absorbencia a 593 nm, esta lectura corresponde al blanco. Posteriormente, se adicionan 10  $\mu$ L de la muestra y 30  $\mu$ L de agua, registrando el cambio en la absorbencia después de 0.5 segundos y cada 15 segundos por un tiempo total de 4 minutos. El cambio en la absorbencia ( $\Delta A = A_{4min} - A_{0min}$ ) se calcula y relaciona con el  $\Delta A$  de una solución estándar de Fe(II). El  $\Delta A$  es proporcional a la concentración del antioxidante. Una

unidad FRAP se define arbitrariamente como la reducción de una mol de Fe(III) a Fe(II) (Huang *et al.*, 2005).

La reducción del ion férrico a ferroso a pH bajo (3.6) provoca la formación de un complejo colorido. Los antioxidantes reductores presentes en la muestra reducen al complejo Fe(III)/tripiridiltriazina (TPTZ), que se encuentra en exceso, a la forma ferrosa azul, con el consecuente aumento en la absorbencia a 593 nm (Figura 14).

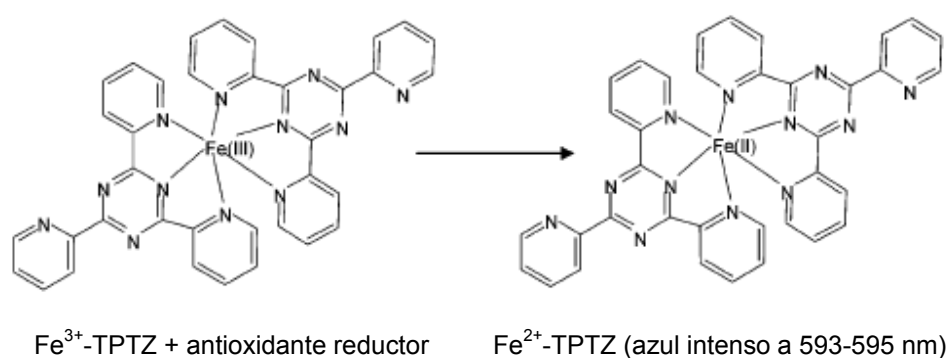


Figura 14. Reacción del ensayo FRAP (Prior *et al.*, 2005).

Los cambios en la absorbencia son lineales sobre un amplio intervalo de concentraciones de mezclas de antioxidantes, plasma y soluciones que contienen un antioxidante en forma pura. La prueba FRAP es barata y muy sencilla, sin embargo, debido a que no hay radicales libres en el sistema, no hay forma de comparar la capacidad antioxidante obtenida con este método con otros métodos que involucran la presencia de radicales. Además el FRAP no permite medir adecuadamente la capacidad antioxidante de ciertos antioxidantes (Somogyi *et al.*, 2007).

### 1.5.11 Método del 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

En su forma de radical estable, el 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) se encuentra disponible en forma comercial y presenta un máximo de absorción UV-vis a 515 nm (Huang *et al.*, 2005). Cuando se adiciona un neutralizador de radicales libres (antioxidante) el DPPH se reduce y su color púrpura característico cambia a amarillo (Figura 15).

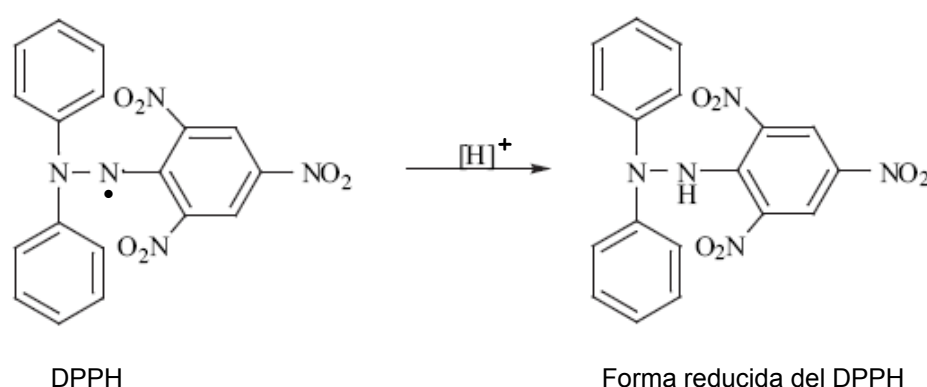


Figura 15. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

El porcentaje de DPPH remanente es proporcional a la concentración de antioxidante y la concentración de antioxidante que provoca una disminución del 50% en la concentración inicial de DPPH se define como EC50.

Desde un punto de vista técnico el método DPPH es simple, pero algunas desventajas limitan su aplicación. El DPPH es un radical nitrógeno de larga vida, que no muestra similitud alguna con los radicales peroxilo altamente reactivos y de vida corta involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo

pueden reaccionar lentamente o incluso ser inertes con el DPPH (Huang *et al.*, 2005).

#### **1.5.12 Método del N,N-dimetil-p-fenilenediamina (DMPD).**

Es un método para medir la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos que emplea N,N-dimetil-p-fenilenediamina (DMPD). El radical catión de este compuesto proporciona una solución coloreada estable por adición de cloruro férrico  $\text{Fe}^{3+}$  (Böhm y Schlesier, 2004). Los antioxidantes capaces de transferir un átomo de hidrógeno al radical provocan la decoloración de la solución, la cual se mide espectrofotométricamente a 505 nm por aproximadamente 10 minutos. La eficiencia antioxidante se expresa en equivalentes Trolox a partir de una curva calibrada de concentraciones de Trolox. Sin embargo, la presencia de ácidos orgánicos puede interferir con esta evaluación.

#### **1.5.13 Otros métodos de evaluación de la capacidad antioxidante.**

Además de los pruebas mencionadas anteriormente existen muchos otros métodos para evaluar la capacidad antioxidante que involucran pruebas de fotoquimioluminiscencia (PCL), quimioluminiscencia, pruebas electroquímicas como: ESR (resonancia del espín del electrón) y Briggs-Rauscher (Böhm y Schlesier, 2004), pruebas de voltimetría cíclica, HPLC (Cromatografía de líquidos de alta definición) (Roginsky y Lissi, 2005), pruebas que actúan sobre especies reactivas del oxígeno específicas como el anión superóxido, el óxido nítrico, peróxido de hidrógeno (Kaur y Geetha, 2006), radical hidroxilo, radical peroxilo, ácido hipocloroso (Sánchez-Moreno, 2002), etcétera.

### 1.6 Estudios comparativos.

Aún cuando muchos de los métodos mencionados anteriormente demuestran ser útiles para determinar si un compuesto o extracto en particular es un antioxidante efectivo, es necesario utilizar varios métodos en una variedad de condiciones, de manera que se pueda describir correctamente la capacidad antioxidante *in vitro* (MacDonald *et al.*, 2006). Resulta interesante comparar las distintas pruebas (Cao y Prior, 1998), ya que aunque se obtengan valores distintos, al aplicar diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante, se puede observar si existe una tendencia entre las muestras analizadas, en cuanto a cual es la que presenta una capacidad antioxidante mayor. Cabe señalar que los estudios comparativos reportados sobre estos métodos muestran claras diferencias en los resultados entre prueba y prueba (Kuskoski *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2005; Katsube *et al.*, 2004). Lo anterior no es sorprendente, ya que los diferentes métodos se llevan a cabo bajo condiciones distintas de pH, concentración y tipo de antioxidante estándar, temperatura, etcétera.

### 1.7 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS).

Durante los últimos años el compuesto cromógeno 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) ha sido utilizado en un gran número de estudios que determinan la capacidad antioxidante de muestras de alimentos.

Sigma-Aldrich® comercializa al ABTS como una sal de diamonio  $(\text{NH}_4)_2\text{-ABTS}$  que presenta una vida media de tres años (Figura 16).

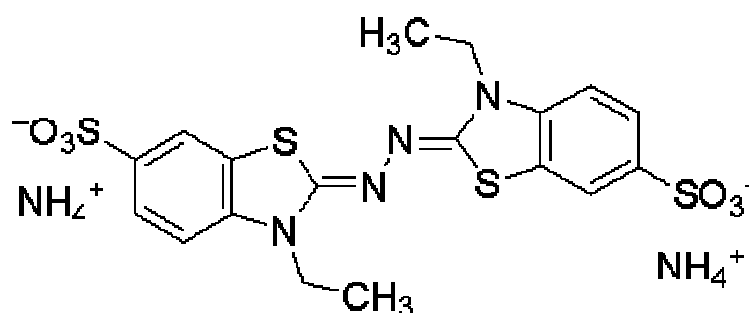


Figura 16. Estructura química del ABTS ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)).

Algunas de sus características fisicoquímicas más importantes son: presenta una estabilidad química elevada, es soluble en agua, posee un espectro de absorción UV-visible característico con un pico de absorción a una longitud de onda de 340 nm (Arnao *et al.*, 1996), no inhibe a las enzimas y no es tóxico (Childs y Bardsley, 1975). Las soluciones de ABTS son poco coloridas, Sigma-Aldrich® señala que su tonalidad varía de verde claro a verde-amarillo.

El ABTS cuando se oxida por métodos químicos o enzimáticos (Figura 17) produce tanto al radical catiónico  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , como al dicatión  $\text{ABTS}^{2+}$  (Reis-Lima *et al.*, 2005; Branchi *et al.*, 2005; Childs y Bardsley, 1975; Solís-Oba *et al.*, 2005).



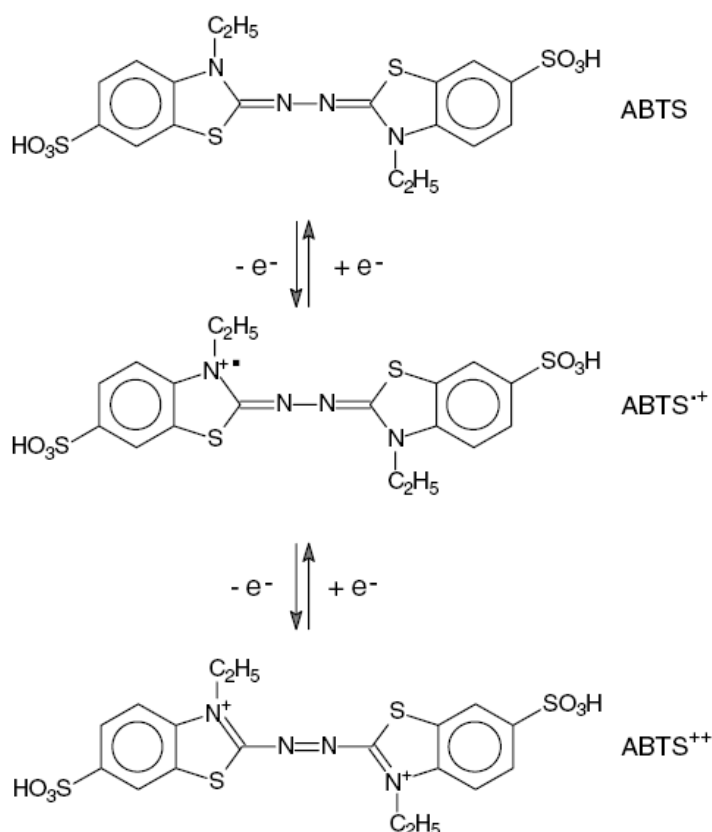


Figura 17. Oxidación del compuesto ABTS (Fabbrini *et al.*, 2002).

La generación del radical ABTS<sup>•+</sup> vía enzimática se logra al emplear oxido-reductasas que transfieren un electrón, como en el caso de las peroxidasa (Osman *et al.*, 2006). Algunos autores mencionan que el ABTS<sup>•+</sup> y el ABTS<sup>2+</sup> pueden ser producidos por la lacasa (Bourbonnais *et al.*, 1998; Solís-Oba *et al.*, 2005; Branchi *et al.*, 2005).

Durante el proceso de oxidación se presenta un cambio de coloración en la solución provocado por la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> que se caracterizan por poseer un color verde-azul intenso que absorbe en la región visible. El radical posee cuatro picos de absorción a longitudes de onda de 394, 414, 646 y 728 nm. Las propiedades espectrofotométricas del ABTS

permiten llevar a cabo ensayos colorimétricos para determinar actividad enzimática al aplicar la Ley de Lambert-Beer (Solís-Oba *et al.*, 2005).

La mayoría de los trabajos que miden la actividad enzimática de la lacasa utilizando al ABTS como sustrato reportan que el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  se detecta en longitudes de onda cercanas a los 414 nm. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a los valores del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  en el intervalo de longitudes de onda de 414-436 nm, aún cuando los valores obtenidos se han llevado a cabo en soluciones acuosas en un intervalo de pH 4-5 (Solís-Oba *et al.*, 2005). Por ejemplo, Childs y Bardsley (1975), Bourbonnais y Paice (1988) y Johannes y Majcherczyk (2000) reportan un coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 420 nm, mientras que Soares *et al.* (2001) utilizaron un coeficiente de extinción de  $\epsilon = 43200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a la misma longitud de onda, Scott *et al.* (1993) asignaron un  $\epsilon = 34700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 417 nm, Gouka *et al.* (2001) reportaron un valor de  $\epsilon = 35000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a una longitud de 414 nm y Muñoz *et al.* (1997) indicaron un  $\epsilon = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 436 nm.

Se ha observado que la absorción del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  en solución es dependiente de la cantidad remanente de ABTS sin reaccionar. Los datos fisicoquímicos (espectro de absorción, coeficiente de extinción molar) describen al radical como un compuesto puro (Childs y Bardsley, 1975). La absorción del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  en soluciones utilizadas en pruebas enzimáticas depende de la cantidad de sustrato (ABTS reducido) sin reaccionar presente en la mezcla. En presencia de ABTS, el radical muestra una menor absorción en las longitudes de onda ( $\lambda$ ) cercanas a los 420 nm y un aumento de aproximadamente 12 nm en las longitudes de onda de los picos de absorción cercanos a los 600 nm causado posiblemente, por la formación de complejos  $\text{ABTS}/\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Es importante mencionar que los valores calculados con un coeficiente de extinción molar de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  en

dichas longitudes de onda, resultan en una subestimación de la actividad enzimática.

### **1.8 Lacasa.**

Las enzimas denominadas lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioxígeno oxidoreductasa), pertenecen a la familia de las oxidasas con núcleo azul multicobre. Dichas enzimas catalizan la oxidación monoelectrónica de distintos sustratos a expensas de oxígeno molecular. El interés en estas enzimas radica en que trabajan simplemente con el aire produciendo agua como único subproducto. Las lacasas se han utilizado en procesos que van desde aplicaciones en la industria textil, la industria de la pulpa y del papel, hasta procesos de producción de alimentos y biorremediación de suelos. Además han sido utilizadas en síntesis orgánica, utilizando sustratos fenólicos y aminas, para la producción de dímeros y oligómeros derivados del acoplamiento de radicales reactivos intermedios.

Las lacasas son glucoproteínas que se encuentran de manera natural en plantas superiores y en un gran número de especies de hongos. En el siglo XIX Yoshida describió por primera vez a la lacasa como un componente de los ductos de resina del árbol de la laca *Rhus vernicifera*.

Las reacciones catalizadas por las lacasas consisten en la oxidación monoeléctrica de moléculas de sustrato (fenoles, aminas alifáticas o aminas aromáticas) que favorecen la formación de radicales reactivos. El proceso redox ocurre por la transferencia de electrones entre los cuatro átomos de cobre que forman el centro catalítico de la enzima. Dichos átomos son los que le confieren el color azul a las lacasas debido a la intensa absorción electrónica de los enlaces Cu-Cu.

El resultado final de cada ciclo catalítico es la producción de dos moléculas de agua a partir de la reducción de una molécula de oxígeno, con la consecuente oxidación de cuatro moléculas de sustrato que producen los radicales reactivos correspondientes (Figura 18).

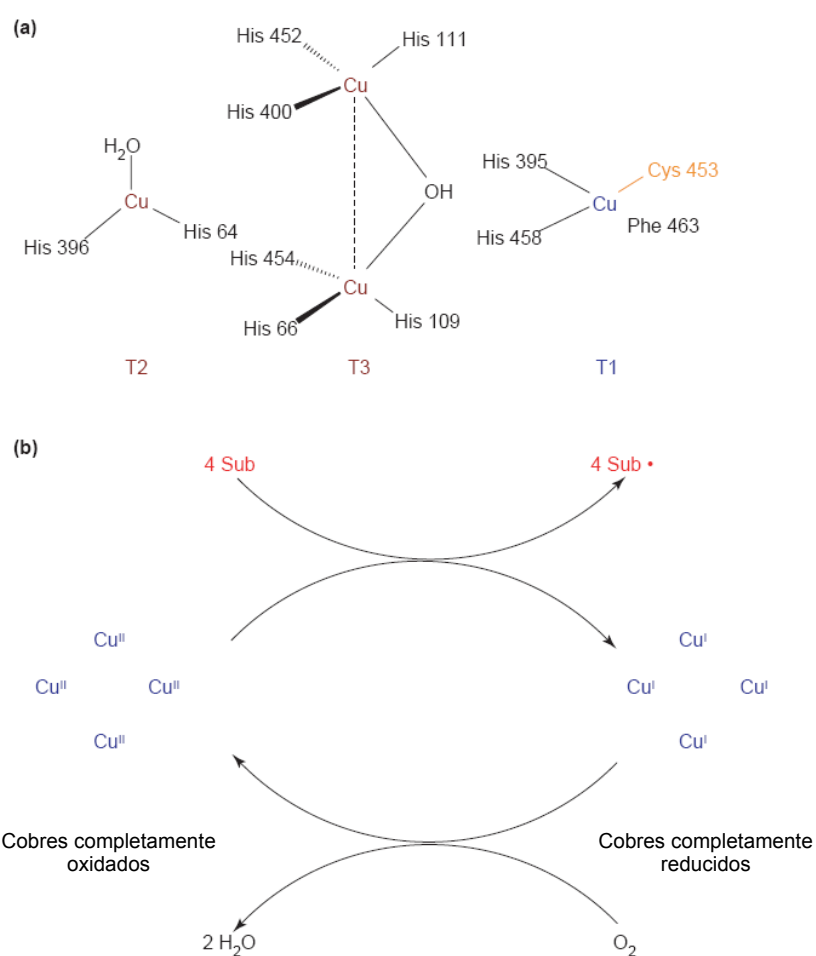


Figura 18. Estructura del sitio activo y ciclo catalítico de las lacasas: (a) Modelo del arreglo catalítico de cuatro átomos de cobre de una lacasa fúngica obtenida de *Trametes versicolor*.

(b) Representación esquemática del ciclo catalítico de la lacasa (Riva, 2006).

### 1.9 Sistema ABTS/lacasa.

El sistema ABTS/lacasa es un sistema catalítico redox que ha sido aplicado en procesos biotecnológicos como: la decoloración de mezclillas en la industria textil (Shelke, 2001), bioblanqueo de pulpa de papel, remediación de suelos, etcétera (Riva, 2006). La característica principal de este sistema es la utilización del compuesto ABTS para la formación de un radical libre  $ABTS^{\bullet+}$  que actúa como un mediador entre la enzima y el sustrato, facilitando la acción de la enzima.

El sistema ABTS/lacasa puede producir el radical  $ABTS^{\bullet+}$ , mediante una reacción de transferencia de un electrón en presencia de oxígeno atmosférico ( $O_2$ ), dicha reacción se aprecia en la Figura 19.



Figura 19. Producción del radical  $ABTS^{\bullet+}$  por acción de la enzima lacasa en presencia de  $O_2$ .

El uso del sistema ABTS/lacasa como sustituto de diversos procesos químicos tradicionales, permite reducir la contaminación provocada por el uso de compuestos de elevada toxicidad, que producen una gran cantidad de subproductos difíciles de eliminar.

Debido a sus características y propiedades, el sistema ABTS/lacasa podría ser caracterizado y utilizado como una variante del método ABTS/ $H_2O_2$ /HRP original (Arnao *et al.*, 1996) para determinar la capacidad antioxidante de muestras de alimentos.

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Los antioxidantes no sólo son de interés en el área de alimentos al emplearse como sustancias que retardan el deterioro de los productos, sino también en otras áreas como la Biotecnología y la Medicina.

Los antioxidantes al estar presentes en las células en determinadas concentraciones, retrasan o impiden el proceso de oxidación de un sustrato al actuar sobre los radicales libres; considerando al sustrato como casi toda molécula orgánica o inorgánica presente en la célula, por ejemplo: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

La actividad de los antioxidantes se usa como un parámetro que se relaciona directamente con el potencial de protección que pueden brindar dichos compuestos a los organismos, al reducir el daño celular provocado por las especies reactivas del oxígeno (ROS). La estimación de la actividad antioxidante se realiza tomando en cuenta la acción combinada de los compuestos antioxidantes presentes en un alimento, reportando el potencial antioxidante, como la capacidad antioxidante total (TAC).

En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos analíticos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias, sin embargo, muchos de los métodos reportados requieren de reactivos costos, equipos sofisticados o tiempos prolongados para realizar las determinaciones.

Los métodos espectrofotométricos que involucran la transferencia de electrones para la formación de radicales libres como: DPPH, DMPD Y ABTS, se utilizan frecuentemente para evaluar la capacidad antioxidante

total, puesto que son métodos relativamente sencillos, rápidos, no muy costosos y fácilmente reproducibles en el laboratorio.

En particular, el método para evaluar la capacidad antioxidante total de muestras líquidas de alimentos que involucra la utilización del compuesto ABTS en la generación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  ha sido empleado y reportado por un gran número de investigadores alrededor del mundo. Este método ha sufrido varias modificaciones desde su primera aparición, que particularmente se centran en la forma en que se produce el radical  $ABTS^{\bullet+}$ , en base a esto podemos dividir a los métodos para evaluar la capacidad antioxidante total que emplean ABTS en:

- ✦ Métodos químicos y electroquímicos.
- ✦ Métodos enzimáticos.
- ✦ Métodos que emplean proteínas no enzimáticas con bases hemo (metmioglobina y metahemoglobina).

Los métodos químicos y electroquímicos generan el radical  $ABTS^{\bullet+}$  al emplear sustancias como el  $MnO_2$ , persulfato de potasio, 2,2'-azo-bis(2-aminopropano), peroxidisulfato de potasio, o bien, celdas electroquímicas y sistemas de flujo continuo. Estas variantes suelen ser poco convenientes, ya que la generación del radical puede tardar hasta 16 horas.

Por otro lado, los métodos que emplean proteínas no enzimáticas como metmioglobina y metahemoglobina que permiten generar el radical  $ABTS^{\bullet+}$  y evaluar capacidad antioxidante de muestras biológicas (Osman *et al.*, 2006), han resultado ser poco reproducibles y confusos.

Hasta el momento, el único método ABTS enzimático para la evaluación de la capacidad antioxidante, es el método que utiliza a la peroxidasa de rábano ( $ABTS/H_2O_2/HRP$ ). Este método requiere de peróxido

de hidrógeno además de la enzima y del ABTS, para que se lleve a cabo la formación de radicales.

Es debido a lo anterior, que el estudio y optimización del sistema modelo ABTS/lacasa permitirá obtener un método de evaluación de la capacidad antioxidante de muestras líquidas de alimentos, sencillo, rápido y fácilmente reproducible en el laboratorio, ya que el sistema ABTS/lacasa produce al radical  $ABTS^{\bullet+}$ , en presencia de oxígeno atmosférico ( $O_2$ ), por tanto no es necesario el empleo de reactivos adicionales.



### 3. OBJETIVOS.

#### ⊕ **Objetivo General:**

Desarrollar un método de evaluación de la capacidad antioxidante en alimentos utilizando un sistema modelo para la generación de radicales libres compuesto por 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) y lacasa que es una polifenoloxidasas.

#### ⊕ **Objetivos específicos:**

1. Evaluar si el producto comercial DeniLite IIS, que contiene lacasa como parte de su formulación, puede utilizarse como tal para el desarrollo de un método de evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos.
2. Optimizar la concentración de enzima lacasa de dos fuentes: DeniLite IIS y *Rhus vernicifera* para el desarrollo de un método de evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos.
3. Optimizar el pH de reacción del sistema ABTS/lacasa para el desarrollo de un método de evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos.
4. Optimizar la concentración de antioxidante (ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico) para la construcción de una curva estándar que permita estimar la capacidad antioxidante de un alimento.
5. Evaluar el intervalo de linealidad de una curva estándar para desarrollar un método de evaluación de la capacidad antioxidante utilizando el sistema ABTS/lacasa.

#### 4. HIPÓTESIS.

La enzima lacasa con actividad polifenol oxidasa es capaz de generar el radical libre estable  $ABTS^{\bullet+}$  a partir del compuesto ABTS, el cual se puede detectar a una longitud de onda de 728 nm. Esta propiedad puede ser útil debido a que con el sistema ABTS/lacasa se medirá la capacidad antioxidante de todos los compuestos hidrosolubles presentes en un alimento.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Enzima lacasa y reactivos.

Se emplearon dos fuentes de lacasas en los ensayos: la primera se obtuvo del producto comercial denominado DeniLite IIS de Novo Nordisk. El DeniLite IIS se ha utilizado en industria textil, particularmente en los procesos de acabado de mezclilla teñida con índigo. Además de la enzima lacasa, este producto contiene al compuesto mediador ácido fenotiazin-10-propiónico y un surfactante no iónico disueltos en amortiguador fosfatos (Soares *et al.*, 2002). La lacasa que contiene este producto es producida originalmente por el hongo termofílico *Myceliophthora thermophila*, pero ha sido clonada y expresada en *Aspergillus oryzae* (Berka *et al.*, 1997); la segunda lacasa es distribuida en forma comercial por Sigma y fue descrita por Yoshida en el siglo XIX, ésta se obtiene de exudados de los ductos de resina del árbol japonés *Rhus vernicifera* (Riva, 2006). El 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS), ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico), ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico) y la albúmina bovina fueron obtenidos de Sigma, por otro lado, el ácido L-(+)-ascórbico (vitamina C) fue obtenido de J.T. Baker.

### 5.2 Preparación de la solución de lacasa de DeniLite IIS.

Se disolvió 0.1 g de DeniLite IIS en 5 mL del amortiguador correspondiente (Cuadro III). Se mantuvo la mezcla en agitación moderada y constante por aproximadamente 5 horas en un baño con hielo. La solución final de DeniLite IIS se almacenó en tubos Eppendorf de 1 mL y se congeló a -20 °C para su uso posterior.

Cuadro III. DeniLite IIS disuelto en 5 mL de amortiguador.

Amortiguador	pH	Concentración final de la solución (mg/mL)
HCl-KCl	2	20
Glicina-HCl	3	20
Acetatos	4, 5 y 6	20
Fosfatos	7 y 8	20

### 5.3 Preparación de la solución madre de lacasa de *Rhus vernicifera*.

Se disolvió 0.01 g de lacasa en 2 mL de agua. Se mantuvo la mezcla en agitación moderada y constante por aproximadamente 2 horas en un baño con hielo. La solución final de lacasa se almacenó en tubos Eppendorf de 1 mL y se congeló a -20 °C. Posteriormente, se descongeló la solución madre de lacasa manteniéndola en un baño LAB-LINE® 3582 a 25 °C por una hora y se realizaron diluciones 1:25, 1:50 y 1:100, utilizando las mismas soluciones amortiguadoras de acuerdo al pH, empleadas en el caso del producto DeniLite IIS.

### 5.4 Determinación de proteína.

La cantidad de proteína presente en la solución, tanto de DeniLite IIS, como de lacasa de *Rhus vernicifera* se determinó por triplicado utilizando el método de Bradford (1976). A 5 mL del reactivo de azul de Comassie en ácido fosfórico se le adicionaron 100 µL de la solución de enzima (DeniLite IIS o lacasa de *Rhus vernicifera*), se agitó vigorosamente la mezcla anterior en un vortex, transcurridos 10 min se midió la absorbencia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína de la muestra se obtuvo al interpolar la absorbencia medida en una curva patrón de proteína obtenida a

partir de diluciones de albúmina bovina 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL en solución salina 0.15 M.

### **5.5 Caracterización espectrofotométrica del sistema ABTS/lacasa.**

Para determinar la longitud de onda ( $\lambda$ ) a la cual se llevarían a cabo las cinéticas se realizó una caracterización espectrofotométrica del sistema ABTS/lacasa. Para ello se prepararon las mezclas de reacción reportadas en el Cuadro IV.

Se realizaron barridos espectrofotométricos a 25 °C en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 800 nm para observar los máximos de absorción para cada uno de los casos. Las determinaciones se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10 UV-Vis *scanning*<sup>®</sup>, utilizando celdas de acrílico de 1 mL con un recorrido óptico de 1 cm. Lo anterior se realizó también para observar interferencias espectrales por efecto de los componentes presentes en cada mezcla.

Cuadro IV. Mezclas de reacción del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*.

LACASA DE DENILITE IIS	LACASA DE <i>Rhus vernicifera</i>
0.06 U/mL de DeniLite II en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.	0.16 U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.
0.06 U/mL de DeniLite IIS y ácido gálico 30 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.	0.16 U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ácido gálico 400 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.
ABTS 0.05 mM, 0.06 U/mL de DeniLite IIS y ácido gálico 30 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.	ABTS 0.05 mM, 0.16 U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> y ácido gálico 400 $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.
ABTS 0.05 mM en amortiguador acetatos 0.01 M pH 4.	ABTS 0.05 mM en amortiguador acetatos 0.01 M pH 4.
Formación del radical ABTS <sup>•+</sup> en presencia de 0.06 U/mL de lacasa de DeniLite IIS en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.	Formación del radical ABTS <sup>•+</sup> en presencia de 0.16 U/mL de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.

Cabe mencionar que fue necesario utilizar una concentración mayor de lacasa de *Rhus vernicifera*, comparada con la utilizada con el DeniLite IIS, debido a que al utilizar concentraciones de lacasa de *Rhus vernicifera* cercanas a las 0.06 U/mL se obtenía una respuesta menor en la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>.

### 5.6 Determinación de la actividad enzimática de la lacasa.

La actividad de la lacasa se estimó midiendo el cambio en la absorbencia a una longitud de onda de 728 nm, empleando ABTS como sustrato. Las mezcla de reacción contenían: (a) ABTS 0.5 mM, amortiguador acetatos 0.1 M a pH 5 y dilución de DeniLite IIS 1 ó 5 mg/mL y (b) ABTS 0.5 mM, amortiguador acetatos 0.1 M a pH 5 y dilución de lacasa de *Rhus vernicifera* en concentraciones 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL, respectivamente. Las cinéticas se llevaron a cabo por triplicado durante un tiempo total de 3 min, midiendo el cambio en la absorbencia cada 15 s a 25 °C (Sólis-Oba, 2005; Torres-Barajas, 2006). Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como los micromoles de ABTS<sup>•+</sup> formados por minuto en un mililitro, la actividad específica fue definida como unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína (U/mg).

### 5.7 Efecto del pH en la actividad de la lacasa de: DeniLite IIS y *Rhus vernicifera*.

Se estimó la actividad de una disolución de DeniLite IIS a pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. La mezcla de reacción consistió en ABTS 0.5 mM en el amortiguador correspondiente 0.1 M y DeniLite IIS 2 mg/mL. Por otro lado, la actividad de la lacasa de *Rhus vernicifera* se estimó a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; la mezcla de reacción consistió en ABTS 0.5 mM en el amortiguador correspondiente 0.1 M y dilución de lacasa en concentración 2 mg/mL.

Los amortiguadores de pH 1 y 2 fueron de HCl-KCl, el amortiguador de pH 3 fue de glicina-HCl, los amortiguadores de pH 4, 5 y 6 fueron de acetatos y finalmente, los amortiguadores de pH 7 y 8 fueron de fosfatos. Las cinéticas en ambos casos, se llevaron a cabo por triplicado durante un tiempo total de 3 min a 25 °C, midiendo el cambio en la absorbencia cada 15 s a una longitud de onda de 728 nm.

### 5.8 Evaluación del efecto del pH y la concentración de lacasa en el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>.

Para evaluar el efecto del pH y la concentración de enzima lacasa (DeniLite IIS o *Rhus vernicifera*) en el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> se realizó un diseño factorial 2<sup>2</sup> con un punto central, tanto para la lacasa de DeniLite IIS, como para la lacasa de *Rhus vernicifera*, dichos diseños se muestran en el Cuadro V y VI, respectivamente.

Cuadro V. Diseño factorial para lacasa de DeniLite IIS.

Orden de la corrida	Puntos centrales	pH	Concentración de lacasa (U/mL)
1	1	4	0.06 ± 0.001
2	0	3	1.07 ± 0.05
3	1	4	0.59 ± 0.06
4	1	2	0.110 ± 0.01
5	1	2	0.003 ± 0.0007

Cuadro VI. Diseño factorial para lacasa de *Rhus vernicifera*.

Orden de la corrida	Puntos centrales	pH	Concentración de lacasa (U/mL)
1	1	5	0.081 ± 0.003
2	0	4	0.16 ± 0.004
3	1	5	0.05 ± 0.001
4	1	3	0.34 ± 0.02
5	1	3	0.38 ± 0.006

Las cinéticas se llevaron a cabo por triplicado midiendo el cambio en la absorbencia a 25 °C y a una longitud de onda de 728 nm cada min por un



tiempo total de 1 h. La mezcla de reacción consistió en ABTS 0.5 mM, amortiguador correspondiente 0.1 M (pH 2, 3, 4 ó 5), DeniLite IIS (1, 2 ó 3 mg/mL) o lacasa de *Rhus vernicifera* (0.05, 0.1 ó 0.2 mg/mL) y distintas concentraciones de ácido gálico (5-1300  $\mu$ M) para cada uno de los casos presentados anteriormente.

### **5.9 Evaluación del intervalo de linealidad de una curva estándar empleando ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*.**

Una vez que se obtuvieron las condiciones de pH y concentración de enzima, tanto para el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS, así como, para el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*, en las cuales se apreciaban los tiempos lag de formación del radical ABTS<sup>•+</sup> (ver Apéndice 1) al utilizar distintas concentraciones de tres antioxidantes diferentes, que en este caso fueron ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico, se graficaron dichas concentraciones de antioxidante contra los tiempos lag obtenidos en cada uno de los sistemas para observar el intervalo de linealidad que se ajustaba al modelo  $y=mx+b$ . De esta manera se obtuvieron curvas estándar de concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>, las cuales se utilizaron para evaluar la capacidad antioxidante total de muestras problema.

### **5.10 Extracción de antioxidantes de residuos agroindustriales.**

Se extrajeron los ácidos fenólicos con actividad antioxidante presentes en dos fuentes de residuos agroindustriales: olote de maíz y rastrojo de amaranto. Para ello, se realizó la extracción de polifenoles totales vía hidrólisis alcalina. Se pesaron 0.8 g de muestra previamente molida y tamizada hasta obtener un tamaño de partícula de 420 micrones, posteriormente se adicionaron 24 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 4 M. Las

muestras se sometieron a un tratamiento térmico a 121 °C por una hora, a continuación, se centrifugó la muestra y el sobrenadante se trató con HCl concentrado hasta obtener un pH de 4. Una vez logrado lo anterior, se midió el volumen de la muestra y se colocó en un embudo de separación, se adicionó una cuarta parte del volumen total de acetato de etilo y se realizó la separación de la fase orgánica, repitiendo dichos pasos tres veces. Finalmente, se centrifugó la fase orgánica a 4500 rpm por 15 minutos y se evaporó el sobrenadante a sequedad en un rotoevaporador en un baño de agua a 40 °C. La extracción de polifenoles totales se realizó por triplicado para cada muestra.

#### **5.11 Aplicación del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* en la evaluación de la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos.**

Con el objetivo de comprobar si los sistemas ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* desarrollados podían ser utilizados para evaluar la capacidad antioxidante total de diversas muestras, se aplicaron ambos métodos en la evaluación la capacidad antioxidante de los polifenoles extraídos del olote de maíz y del rastrojo de amaranto, así como de jugo de naranja fresco.

Las muestras de residuos agroindustriales se reconstituyeron con 6 mL de metanol, se agitaron en un vortex y finalmente se filtraron. La mezcla de reacción para evaluar la capacidad antioxidante utilizando el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS contenía disolución de ABTS 0.5 mM,  $0.063 \pm 0.006$  U/mL de DeniLite IIS y 100  $\mu$ L de muestra problema en un volumen final de 1 mL de amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C. Por otro lado, la mezcla de reacción para evaluar la capacidad antioxidante al usar el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* contenía ABTS 0.5 mM,

$0.17 \pm 0.012$  U/mL de lacasa y 70  $\mu$ L de muestra problema en un volumen final de 1 mL de amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.

Para evaluar la capacidad antioxidante del jugo de naranja fresco, se obtuvieron muestras de 500 mL de jugo recién extraído, de ese volumen se tomaron 25 mL y se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos, se separó el sobrenadante (22 mL) y se determinó la actividad antioxidante total por ambos sistemas. Las condiciones de las mezclas de reacción para evaluar la capacidad antioxidante usando el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* fueron las mismas que en el caso anterior.

Las determinaciones de la capacidad antioxidante se realizaron por triplicado para cada una de las muestras evaluadas a una temperatura de 25 °C.

#### **5.12 Aplicación del método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP.**

Finalmente, para comparar los resultados obtenidos al evaluar la capacidad antioxidante total de muestras problema por los sistemas desarrollados, de manera paralela se determinó la capacidad antioxidante de las muestras anteriores por el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP de acuerdo a la metodología propuesta por Arnao *et al.* (1996) y Ing-Chien *et al.* (2004).

La mezcla de reacción para determinar la capacidad antioxidante contenía disolución de ABTS 2 mM, HRP 1.2 nM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM y 50  $\mu$ L de muestra problema en un volumen final de 1 mL de amortiguador fosfatos 50 mM pH 7.

Nuevamente, las determinaciones de la capacidad antioxidante se realizaron por triplicado para cada una de las muestras evaluadas a una temperatura de 25 °C.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 Caracterización espectrofotométrica del sistema ABTS/lacasa.

Se realizó la caracterización espectrofotométrica UV-Vis para determinar la longitud de máxima absorción de los diferentes compuestos presentes en la mezcla de reacción. En la Figura 20 se muestra el espectro de absorción de la disolución: (a) 0.06 U/mL de DeniLite IIS en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4. Para cada una de las mezclas de reacción se obtuvo un máximo de absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 220 nm que corresponde a la absorción de los enlaces peptídicos de la lacasa (Holme y Peck, 1998). Si bien, la absorción a 280 nm se ha utilizado sistemáticamente para medir concentraciones proteicas, las proteínas también muestran una fuerte absorción en el espectro entre los 180 y 220 nm (Mathews *et al.*, 2002).

Por otro lado, la mezcla que contenía 0.06 U/mL de DeniLite IIS en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 mostró otro máximo de absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) cercana a los 268-270 nm que corresponde al ácido fenotiazin-10-propiónico, compuesto mediador presente como parte de la formulación del DeniLite IIS. Daub *et al.* (2001) y Xiao-Hang Zhang *et al.* (2007) reportaron que los compuestos fenotiazin muestran un máximo de absorción a longitudes de onda cercanas a los 260-270 nm.

Es importante mencionar que de los 360 a los 800 nm no se presentaron cambios en la absorbencia.

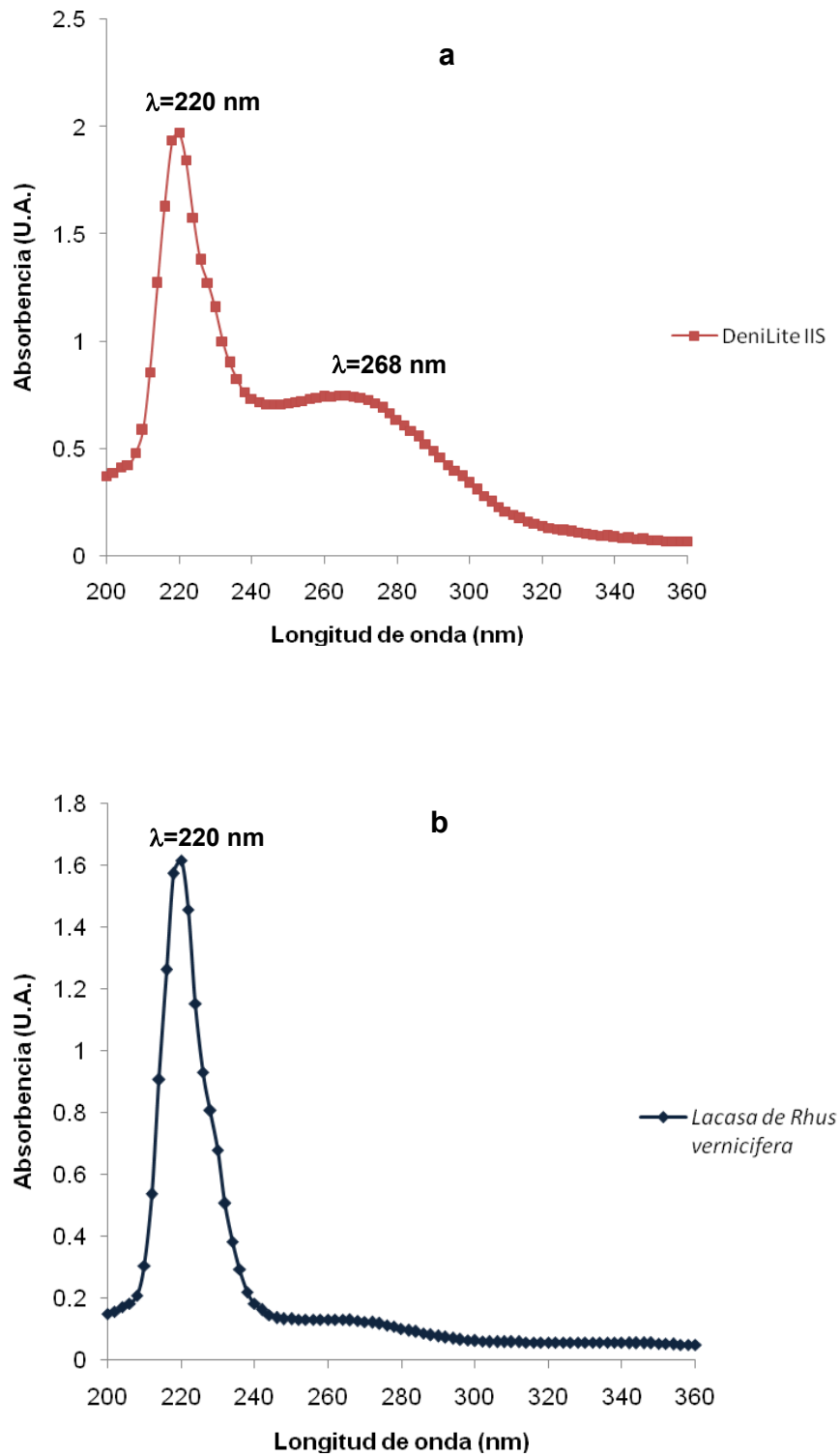


Figura 20. Espectro de absorción a 25 °C de: (a) disolución de DeniLite IIS en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) disolución de lacasa de *Rhus vernicifera* en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.

El motivo por el cual se tuvo que usar una concentración mayor de enzima lacasa de *Rhus vernicifera* (0.16 U/mL), comparada con la utilizada con DeniLite IIS (0.06 U/mL), fue debido a que al emplear concentraciones de lacasa de *Rhus vernicifera* cercanas a las 0.06 U/mL se obtenía una respuesta mucho menor en la formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> detectados a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 728 nm. Lo anterior, pudo deberse probablemente a que al utilizar el compuesto DeniLite IIS, los radicales ABTS<sup>•+</sup> fueran producidos no sólo por la enzima lacasa, sino también por el ácido fenotiazin-10-propiónico, el cual es un compuesto presente en la formulación del DeniLite IIS que ha sido utilizado como un mediador que al actuar en conjunto con la lacasa permite llevar a cabo los procesos de acabado de las mezclillas al actuar sobre el colorante índigo (Soares *et al.*, 2001).

La Figura 21 muestra el espectro de absorción de una disolución de ácido gálico 30  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.

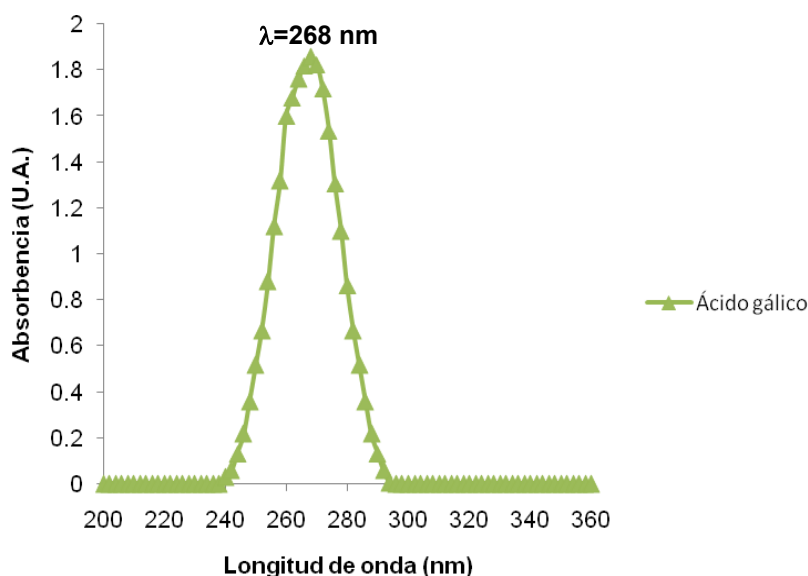


Figura 21. Espectro de absorción de disolución de ácido gálico 30  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.

El ácido gálico mostró un máximo de absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 268 nm. Polewski et al (2002) reportaron que el ácido gálico en soluciones acuosas muestra un máximo de absorción a 260 nm, sin embargo en soluciones ácidas el ácido gálico absorbe a una longitud de onda de 269 nm, lo cual concuerda con el máximo de absorción obtenido para el ácido gálico en este trabajo.

Los espectros de absorción de las mezclas de disolución: (a) 0.06 U/mL de DeniLite IIS y ácido gálico 30  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ácido gálico 400  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 (Figura 22) mostraron dos máximos de absorción, el primero a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 220 nm y el segundo a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 268 nm, dichos máximos corresponden a los picos característicos de la proteína y del ácido gálico, respectivamente.

El motivo por el se incrementó la concentración de ácido gálico en el caso de la dilución que contenía 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 fue debido a que a concentraciones menores, el pico de absorción del ácido gálico no se apreciaba claramente. Sin embargo, aún cuando la concentración de ácido gálico utilizada para este caso fue mayor se obtuvo el mismo pico de máxima absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 268 nm, correspondiente a dicho compuesto.

Es importante mencionar que la disolución que contenía DeniLite IIS no mostró máximos de absorción de los 300 a los 800 nm. De la misma manera, la disolución que contenía lacasa de *Rhus vernicifera* no mostró cambios en la absorbencia de los 320 a los 800 nm.

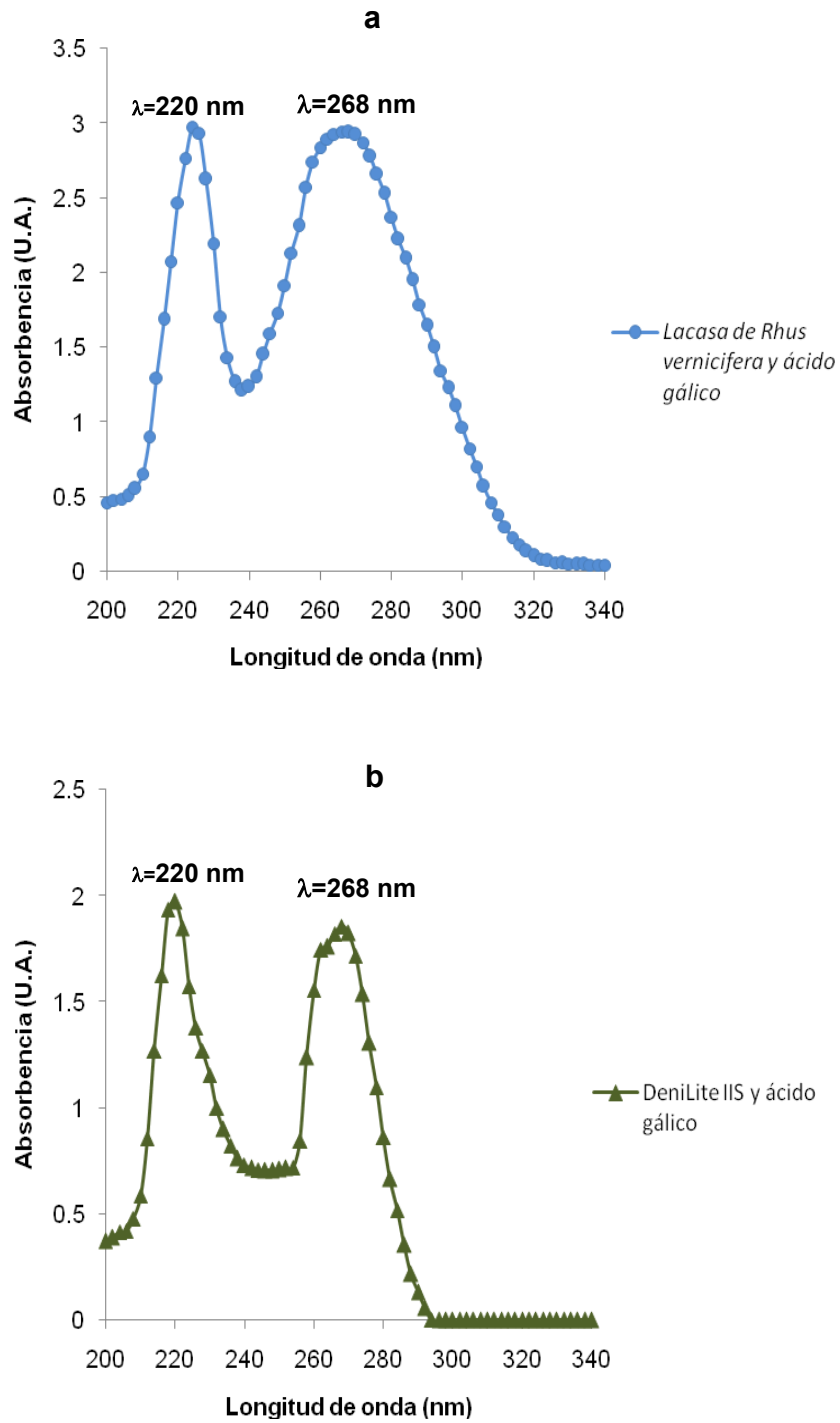


Figura 22. Espectro de absorción a 25 °C de: (a) disolución de DeniLite IIS y ácido gálico 30  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) disolución de lacasa de *Rhus vernicifera* y ácido gálico 400  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.



En el caso de las mezclas: (a) disolución de ABTS 0.05 mM, 0.06 U/mL de DeniLite IIS y ácido gálico 30  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 y (b) disolución de ABTS 0.05 mM, 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ácido gálico 400  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4, se detectaron tres máximos de absorción correspondientes a la proteína ( $\lambda = 220$  nm), al ácido gálico ( $\lambda = 268$  nm) y al grupo azo del ABTS ( $\lambda = 340$  nm; Skoog *et al.*, 1995). En la Figura 23 se observan los máximos de absorción correspondientes a la proteína y al ABTS, los cuales, se apreciaron claramente en ambas mezclas. Sin embargo, el máximo correspondiente al ácido gálico apareció traslapado en el espectro que contenía DeniLite IIS, debido a la detección del compuesto mediador ácido fenotiazin-10-propiónico, que se encuentra presente en dicho producto (Kulys *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2001), el cual presenta un máximo de absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) entre los 268-270 nm (Daub *et al.*, 2001 y Xiao-Hang Zhang *et al.*, 2007). Contrario a lo que sucedió con la disolución que contenía DeniLite IIS, el espectro de la mezcla que contenía lacasa de *Rhus vernicifera*, permitió apreciar claramente el máximo de absorción del ácido gálico. Cabe mencionar que fue necesario utilizar una concentración diez veces menor de ABTS para poder observar el máximo de absorción que presentó dicho compuesto.

Al igual que en los casos anteriores, no se presentaron cambios en la absorbencia de los 400 a los 800 nm.

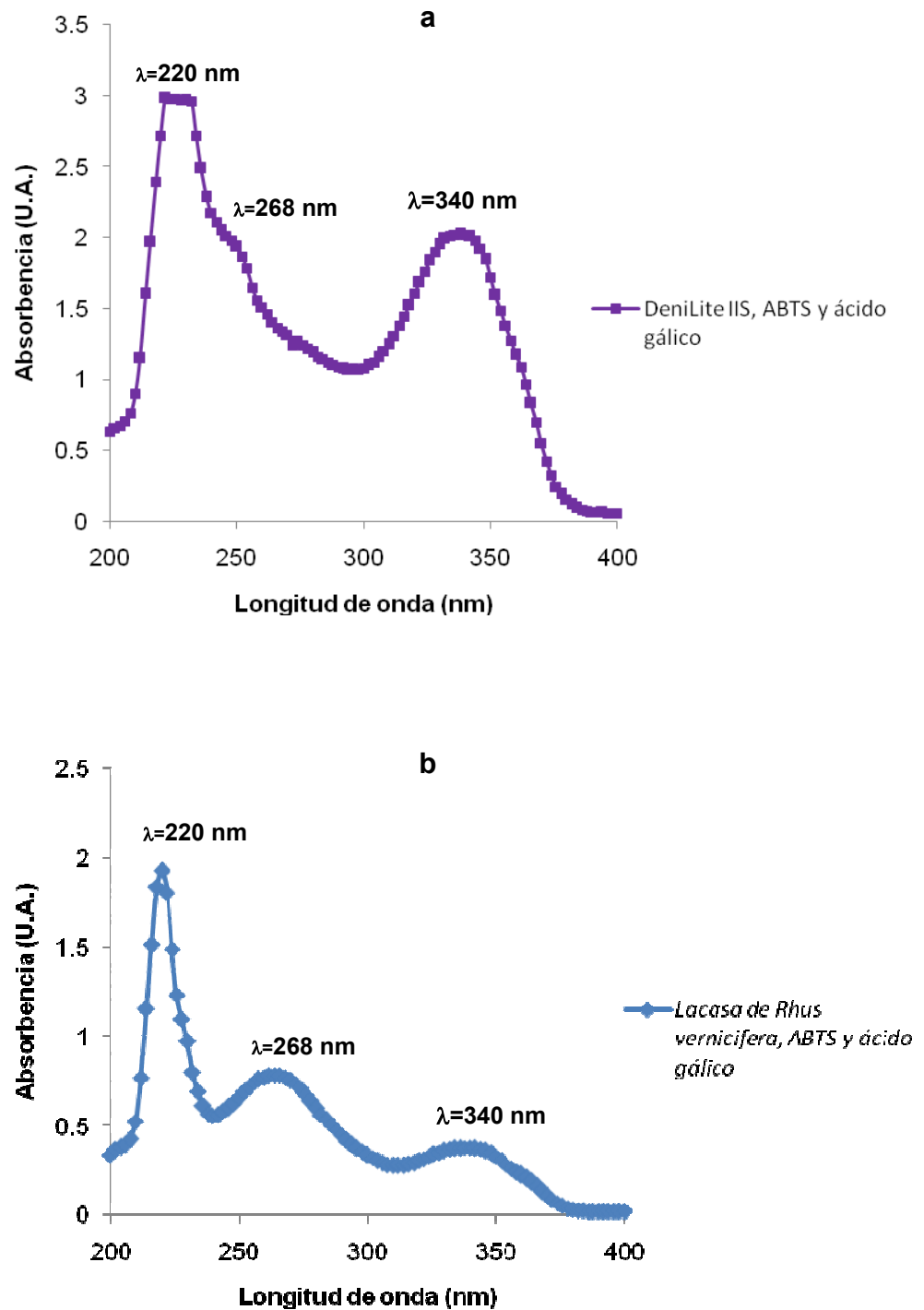


Figura 23. Espectro de absorción a 25 °C de disolución de: (a) ABTS 0.05 mM, 0.06 U/mL de DeniLite IIS y ácido gálico 30  $\mu$ M y (b) ABTS 0.05 mM, 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ácido gálico 400  $\mu$ M en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.

Posteriormente, se monitoreó la oxidación del compuesto ABTS por la lacasa. Originalmente, las mezclas de reacción contenían: (a) 0.06 U/mL de DeniLite IIS y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M a pH 4 y (b) disolución de lacasa de *Rhus vernicifera* 0.16 U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M a pH 4. Sin embargo, fue necesario realizar diluciones 1:10 para cada una de estas mezclas de reacción, con el objetivo de poder observar adecuadamente los máximos de absorción obtenidos.

La Figura 24 muestra los espectros de absorción de las disoluciones: (a) ABTS 0.05 mM en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4 y (b) ABTS<sup>•+</sup> 0.05 mM producido por 0.06 U/mL de DeniLite IIS en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.

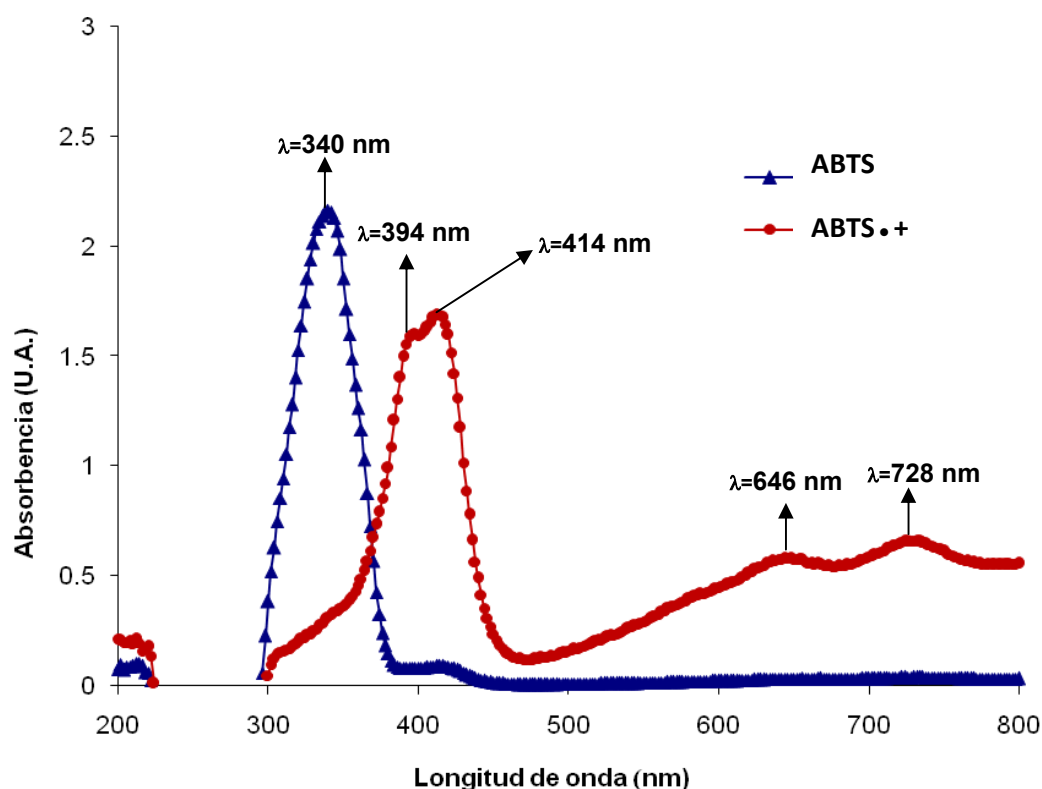


Figura 24. Espectros de absorción a 25 °C de: ABTS 0.05 mM y ABTS<sup>•+</sup> 0.05 mM en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.

En el espectro el ABTS presentó un máximo de absorción a una longitud de onda de 340 nm, mientras que el espectro de la especie ABTS<sup>•+</sup> presentó máximos de absorción en las longitudes de onda 394, 414, 646 y 728 nm.

Scott *et al.* (1993) reportaron tres máximos de absorción para el ABTS<sup>•+</sup> obtenido por oxidación química a pH 7 con Cerio (IV) a 417, 645 y 728 nm. Comparada con la oxidación química, la oxidación enzimática del compuesto ABTS reportada en este estudio, permitió obtener prácticamente los mismos máximos de absorción para el radical ABTS<sup>•+</sup>, excepto por un máximo de absorción adicional obtenido a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 394 nm.

En la Figura 25 se presentan los espectros de absorción de las disoluciones: (a) ABTS 0.05 mM en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4 y (b) ABTS<sup>•+</sup> producido por 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.

De la misma manera que en el caso anterior, fue posible observar los máximos de absorción característicos del radical ABTS<sup>•+</sup> en las longitudes de onda 394, 414, 646 y 728 nm; además se apreciaron los máximos de absorción de la proteína ( $\lambda = 220$  nm) y el máximo de absorción del ABTS ( $\lambda = 340$  nm).

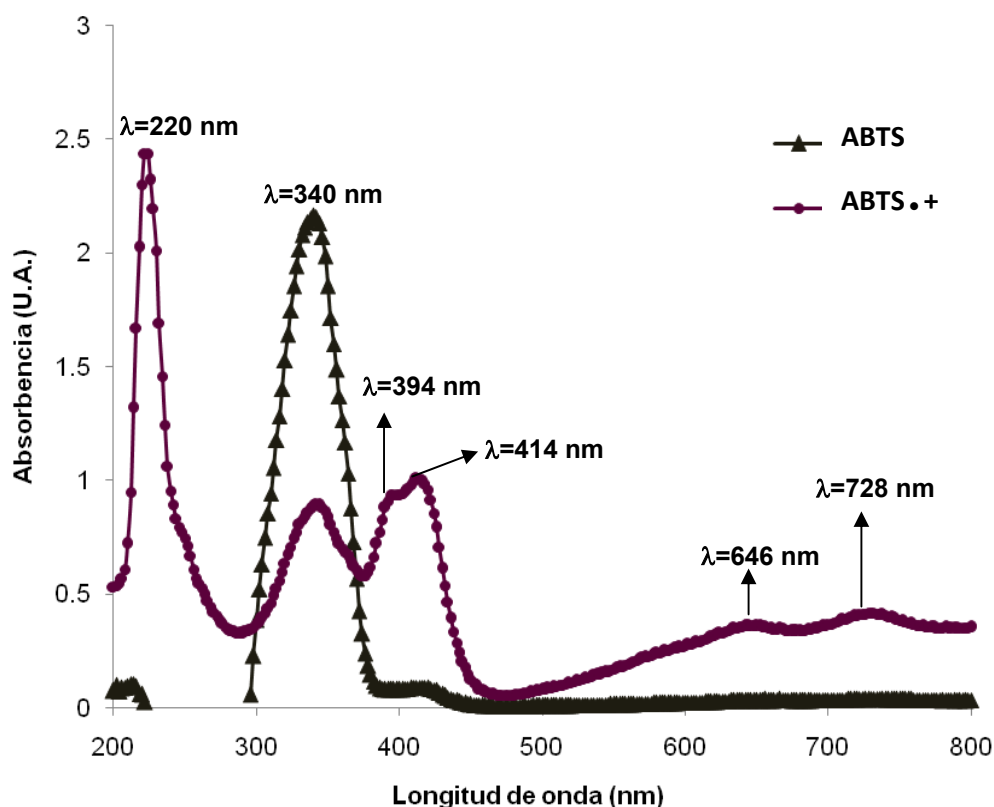


Figura 25. Espectro de absorción a 25 °C de una disolución de: ABTS 0.05 mM y ABTS<sup>•+</sup> producido por 0.16 U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* en amortiguador acetatos 0.01 M a pH 4.

El corrimiento en el máximo de absorción detectado a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 340 nm correspondiente al grupo azo presente en el ABTS reducido, indica que la concentración de ABTS disminuye a medida que la lacasa lleva a cabo la oxidación de dicho compuesto, para la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>.

Solís-Oba *et al.* (2005) reportaron que la electrólisis de ABTS  $\rightarrow$  ABTS<sup>•+</sup> produce cuatro picos de absorción a longitudes de onda de 394, 414, 646 y 728nm, las cuales coincidieron con las longitudes obtenidas por oxidación de ABTS con DeniLite IIS y lacasa de *Rhus vernicifera* en este estudio. Lo anterior implica que tanto el producto DeniLite

IIS en su forma comercial, así como la lacasa de *Rhus vernicifera* pueden ser utilizados para la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> sin la necesidad de llevar a cabo procesos adicionales de purificación, ya que la enzima requiere únicamente de sustrato (ABTS) y oxígeno molecular para llevar a cabo la reacción.

La mayoría de los trabajos consultados en los que se estima la actividad de la lacasa en presencia del compuesto ABTS, se llevan a cabo a longitudes de onda de entre 414 y 420 nm (Johannes y Majcherczyk, 2000; Li *et al.*, 1999). Asimismo, los trabajos relacionados con métodos para evaluar la capacidad antioxidante de extractos hidrosolubles de alimentos, que emplean sistemas enzimáticos que utilizan ABTS como sustrato, para la formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>, estiman el tiempo lag de formación de dichos radicales por acción de antioxidantes a las longitudes de onda antes mencionadas (Arnao *et al.*, 1996; Ing-Chien *et al.*, 2004).

Los parámetros fisicoquímicos (espectro de absorción y coeficiente de extinción molar) describen al radical como un compuesto puro (Childs y Bardsley, 1975). Sin embargo, se ha observado que la absorción del radical ABTS<sup>•+</sup> en soluciones utilizadas en pruebas enzimáticas depende de la cantidad de sustrato (ABTS reducido) sin reaccionar presente en la mezcla. En presencia de ABTS, el radical ABTS<sup>•+</sup> revela una menor absorción en las longitudes de onda cercanas a 420 nm y un desplazamiento causado por un incremento en el pico de absorción cercano a los 600-612 nm debido posiblemente, a la formación de complejos por la presencia de la especie reducida (ABTS) y de la especie oxidada (ABTS<sup>•+</sup>). Por tanto, a una longitud de onda de 414-420 nm se subestima la presencia del radical y en consecuencia la actividad de la enzima, pero dicho efecto puede corregirse al multiplicar los valores de absorbencia obtenidos por un factor de 1.33, de manera que pueda estimarse adecuadamente la actividad de la lacasa al emplear el coeficiente de extinción molar del ABTS<sup>•+</sup>  $\epsilon_{420\text{nm}} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Esta corrección aplica también para las pruebas con peroxidasas que utilizan ABTS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos (Johannes y Majcherczyk, 2000). En la longitud de onda de 728 nm no se observan los fenómenos mencionados anteriormente, pues se presenta una interferencia espectral menor, por tanto,  $\lambda = 728$  nm es la longitud de onda que garantiza que se lleven a cabo correctamente las determinaciones espectrofotométricas que miden la formación del radical ABTS<sup>•+</sup> (Solis-Oba *et al.*, 2005).

Se observó que ABTS, enzima y antioxidante presentes en las mezclas de reacción del sistema modelo ABTS/lacasa no interfieren en las determinaciones de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> a una longitud de onda de 728 nm. Por lo tanto, se fijó esta longitud de onda como la más adecuada para determinar la actividad enzimática, así como, los tiempos lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> en presencia de distintas concentraciones de antioxidante. En trabajos recientes que aplican el método TEAC para evaluar capacidad antioxidante, los cambios en la absorbencia para detectar radicales ABTS<sup>•+</sup> se han monitoreado a 734 nm (Haruenkit *et al.*, 2007; Nenadis *et al.*, 2004), ya que a dicha longitud de onda se garantiza que estén presentes únicamente los radicales ABTS<sup>•+</sup>, eliminando posibles interferencias por la existencia de la especie reducida, de manera que los valores de capacidad antioxidante obtenidos al utilizar distintas concentraciones de antioxidante para la neutralización de radicales ABTS<sup>•+</sup> son más precisos.

### 6.2 Actividad de la lacasa.

En el Cuadro VII se presenta los valores de actividad de la lacasa a pH 5 de DeniLite IIS y de *Rhus vernicifera*. Las diluciones de DeniLite IIS 1:10 tuvieron concentraciones finales de 1 y 5 mg/mL de producto. Por otro lado, las diluciones de lacasa de *Rhus vernicifera* fueron 1:100, 1:50 y 1:25 las cuales tuvieron concentraciones finales de 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL,

respectivamente. Estas diluciones se evaluaron con el fin de encontrar respuestas de actividad adecuadas, de manera que se pudieran utilizar dichas diluciones en el diseño factorial  $2^2$  con un punto central, necesario para evaluar el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> en presencia de ácido gálico. De los resultados reportados en el Cuadro VII se observa que el producto DeniLite IIS y la lacasa de *Rhus vernicifera*, producen radicales libres ABTS<sup>•+</sup> al utilizar al compuesto ABTS como sustrato en presencia de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>).

Cuadro VII. Actividad de la enzima lacasa de DeniLite IIS y de *Rhus vernicifera*.

Fuente de lacasa	Concentración (mg/mL)	Actividad volumétrica (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg proteína)
<i>Rhus vernicifera</i>	0.05	0.05 ± 0.001	0.81 ± 0	0.06 ± 0
	0.1	0.061 ± 0.001	0.84 ± 0.01	0.072 ± 0.0008
	0.2	0.081 ± 0.003	0.97 ± 0.03	0.084 ± 0.002
DeniLite IIS	1	0.030 ± 0.001	0.92 ± 0.006	0.033 ± 0.0002
	5	0.112 ± 0.01	0.97 ± 0.017	0.116 ± 0.002

Trabajos anteriores que han utilizado al DeniLite IIS como fuente de lacasa, reportan actividades específicas de 0.0275 U/mg de proteína. En nuestro caso, la actividad específica obtenida es 16% mayor al utilizar una dilución de 1 mg/mL de DeniLite IIS.

Lo anterior resulta interesante desde el punto de vista económico y funcional, ya que la mayoría de los sistemas enzimáticos que emplean al ABTS como sustrato para la formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> requieren de la incorporación de otros reactivos, por ejemplo peróxido de hidrógeno (Arnao *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha reportado el uso de la lacasa obtenida de DeniLite IIS para la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>, sin embargo



la separación de la lacasa del producto DeniLite IIS ha requerido de un proceso previo de purificación por precipitaciones con acetona (Solís-Oba *et al.*, 2005) o por filtración en cromatografía usando Superdex 75 (Soares *et al.*, 2001). En este caso, se observó que el producto DeniLite IIS puede ser utilizado en su forma comercial para producir radicales  $ABTS^{\bullet+}$  sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación para separar a la enzima lacasa, ya que al utilizar al producto DeniLite IIS como tal, se obtuvo una buena respuesta de actividad y no se presentaron interferencias espectrales por la presencia de los compuestos que forman parte de su formulación, por ejemplo el ácido fenotiazin-10-propiónico, surfactante no iónico y amortiguador fosfatos (Soares *et al.*, 2001).

### 6.3 Efecto del pH en la actividad de la lacasa.

Para establecer las mejores condiciones de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  en los sistemas: ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*, fue necesario medir la actividad enzimática de una disolución de DeniLite IIS 2 mg/mL a valores de pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Asimismo, se midió la actividad enzimática de diluciones de lacasa de *Rhus vernicifera* 2 mg/mL a valores de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

La Figura 26 muestra la curva de actividad en función al pH de: (a) DeniLite IIS y (b) lacasa de *Rhus vernicifera* en amortiguador HCl-KCl a pH 1 y 2, amortiguador glicina-HCl a pH 3, amortiguador de acetatos a pH 4, 5 y 6 y amortiguador de fosfatos a pH 7 y 8. La mezcla de reacción contenía dilución de lacasa y ABTS 0.5 mM en disolución del amortiguador correspondiente 0.1 M. El cambio en la absorbencia se midió a 25 °C a una longitud de onda de 728 nm cada 15 s por un tiempo total de 3 min. La actividad enzimática se calculó como función del valor de la pendiente de la recta obtenida con cada valor de pH.

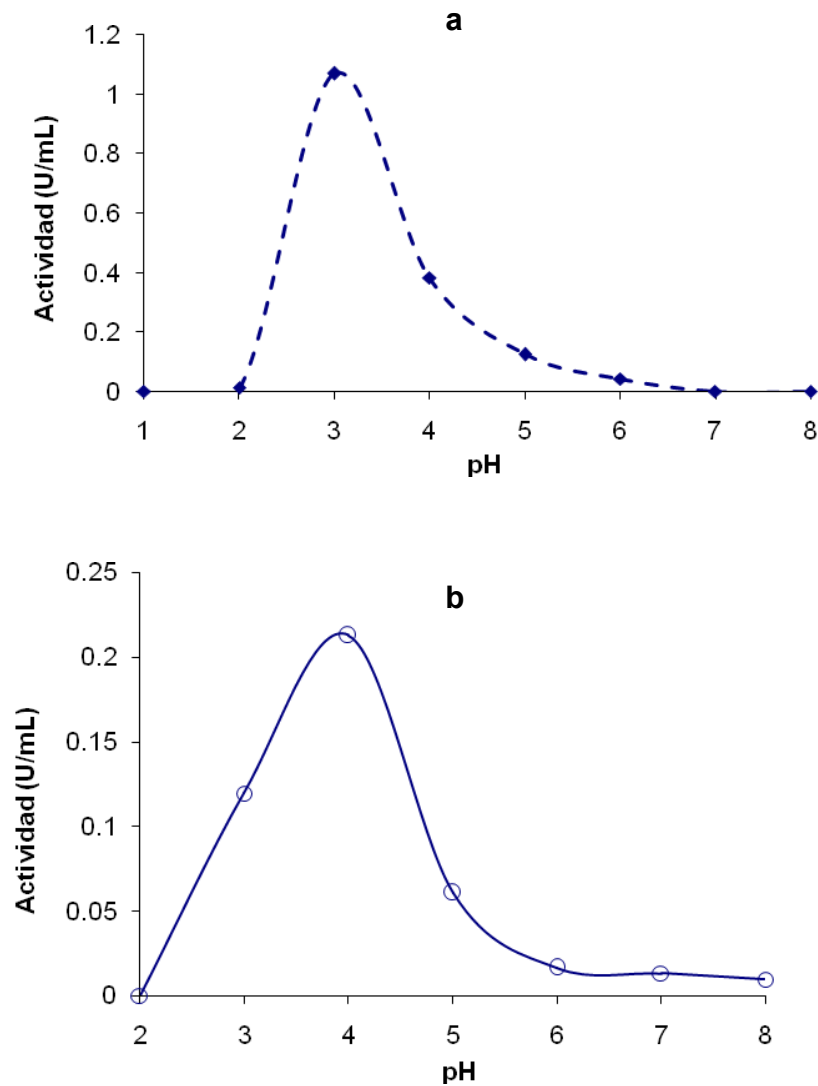


Figura 26. Efecto del pH en la actividad de lacasa a 25 °C de: (a) DeniLite IIS y (b) *Rhus vernicifera*.

La lacasa de DeniLite IIS presentó una actividad máxima a pH 3, sin embargo es interesante resaltar que mostró actividad a pH 2. Se ha reportado que los valores óptimos de pH en los que presenta actividad la lacasa de *Myceliophthora thermophila* se encuentran entre 4 y 7 (Li *et al.*, 1999).

La lacasa de *Rhus vernicifera* presentó una actividad máxima a pH 4. Las variaciones en la actividad de la lacasa de DeniLite IIS y de *Rhus vernicifera* por efecto del pH, sugieren que el valor de pH interviene directamente en el aumento en la interacción de los sitios cobre T1 (en conjunto con los aminoácidos Histidina-Cisteina-Histidina cercanos) y el sitio T3 de la enzima (Piontek *et al.*, 2002), así como, con la alta concentración de protones en el medio que favorece el intercambio de electrones entre ambos cobres, de acuerdo con estudios realizados previamente con lacasa de *Rhus vernicifera* (Morpungo y Desideri, 1980). Otros informes (Castro, 2005) mencionan que a medida que el pH disminuye no se presentan modificaciones en la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato y el grado de disociación del mismo es bajo. Sin embargo, se presenta una mayor afinidad de la enzima por el sustrato, debido probablemente a cambios conformacionales de la enzima en medio ácido. McGuirl y Dooley (1999) mencionan que el cobre tipo II, que forma parte del sitio activo de la enzima, es muy sensible a los cambios en el pH. Los cambios en la estructura del sitio activo de la enzima han sido estudiados mediante EPR y NMR.

En resumen, las variaciones en la actividad de la enzima lacasa a los distintos valores de pH están relacionadas con cambios locales en la enzima y no con cambios en el sustrato ABTS, ya que el potencial de oxidación del ABTS no es dependiente del pH en el intervalo 2-11 (Johannes y Majcherczyk, 2000).

#### **6.4 Evaluación del efecto del pH y la concentración de lacasa en el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>.**

Una vez que se conocieron los valores de pH en los cuales el producto DeniLite IIS y la lacasa de *Rhus vernicifera* presentaban actividad, se realizó un diseño factorial 2<sup>2</sup> con un punto central para evaluar el efecto tanto del pH,

como de la concentración de enzima en el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> empleando diferentes concentraciones de ácido gálico como antioxidante de referencia para cada uno de los experimentos correspondientes al diseño experimental, ya que el ácido gálico ha sido reconocido como un antioxidante efectivo que ayuda a combatir el estrés oxidativo causado por los radicales libres, este compuesto fenólico se encuentra en las plantas (Gandhi y Nair, 2005). Los resultados obtenidos mostraron que tanto el pH como la concentración de enzima tiene un efecto en: la aparición del tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>, o bien, la aparición de un efecto prooxidante por parte del ácido gálico.

#### 6.4.1 Evaluación del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS.

En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos para el sistema compuesto por DeniLite IIS  $0.003 \pm 0.0007$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador HCl-KCl 0.1 M a pH 2, empleando ácido gálico 10, 15, 20, 25, 30, 35, 60 y 300  $\mu$ M. Al realizar la prueba de actividad la enzima mostró una respuesta muy baja, sin embargo, como se aprecia en este gráfico, a concentraciones de ácido gálico de entre 15 y 20  $\mu$ M se obtuvo una respuesta que indica la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>. Al aumentar la concentración de ácido gálico de 10 a 15  $\mu$ M se observó que después de una hora de reacción la absorbencia es 5.2 veces mayor con respecto a 10  $\mu$ M de antioxidante. Mientras que con ácido gálico 20  $\mu$ M la absorbencia incrementó 4.9 veces. Lo anterior indica que probablemente una concentración de ácido gálico de entre 15  $\mu$ M y 20  $\mu$ M provocó la acción de un efecto prooxidante del ácido gálico. Sin embargo, a concentraciones por arriba de 20  $\mu$ M la absorbencia disminuyó, llegando a ser 4.75 veces menor a 300  $\mu$ M con respecto a 10  $\mu$ M de ácido gálico. Ninguna de las concentraciones de ácido gálico probadas permitió observar un tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>, en consecuencia estas condiciones no fueron de utilidad para el desarrollo de este trabajo.

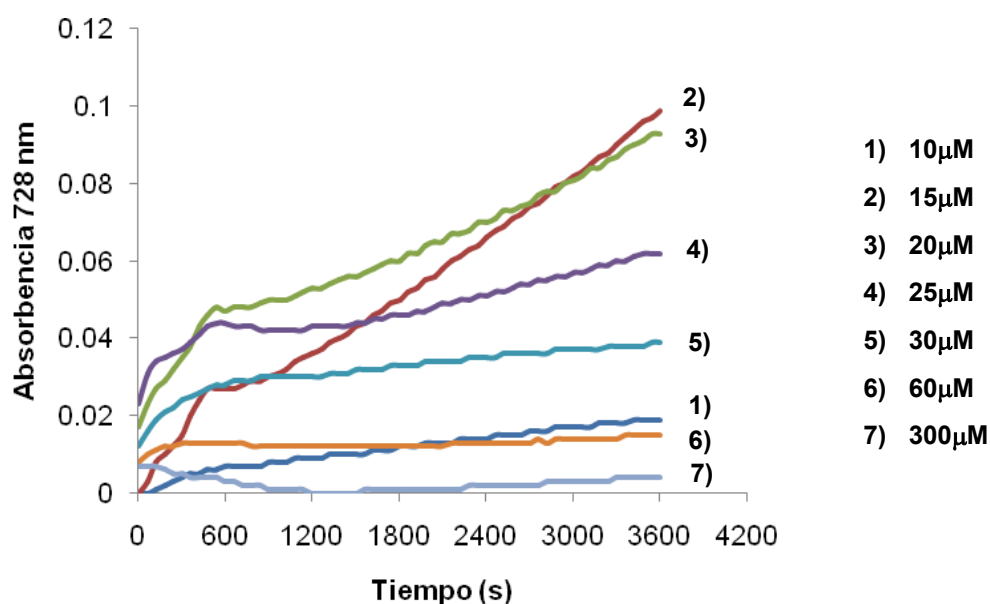


Figura 27. Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS  $0.003\pm 0.0007$  U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador HCl-KCl 0.1 M a pH 2 en presencia de ácido gálico.

Para el caso de DeniLite IIS  $0.110\pm 0.01$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador HCl-KCl 0.1 M a pH 2, se probaron concentraciones de ácido gálico de 20, 30, 40, 60 y 80  $\mu$ M (Figura 28).

A pesar de que la enzima presentó una mayor actividad, ninguna de las concentraciones de ácido gálico probadas mostró la aparición de un tiempo lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$ , por lo que se descartó el uso de estas condiciones.

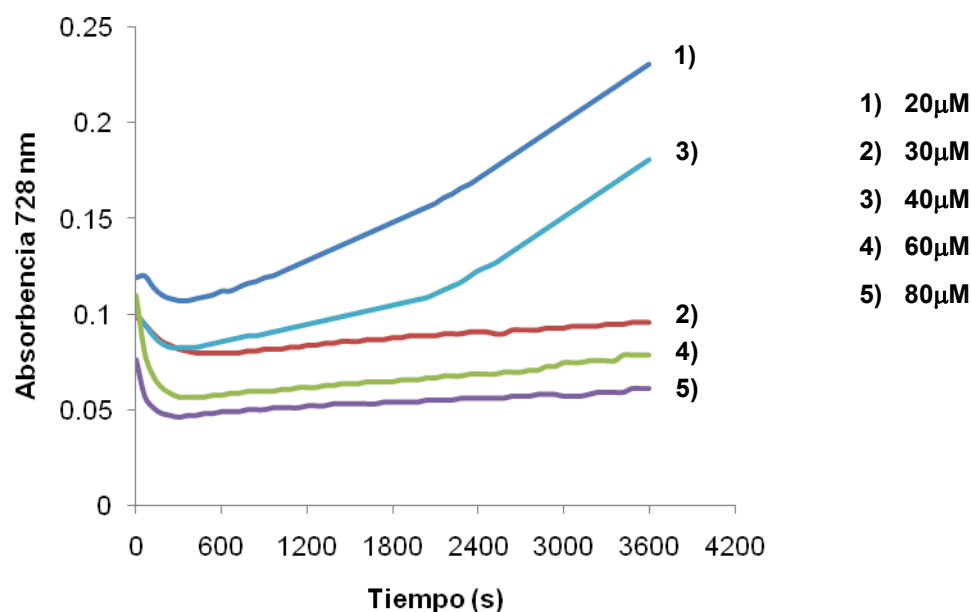


Figura 28. Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS  $0.110 \pm 0.01$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador HCl-KCl 0.1 M pH 2 en presencia de ácido gálico.

En la Figura 29 se aprecian las cinéticas correspondientes a DeniLite IIS  $1.07 \pm 0.05$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3. Las cinéticas se llevaron a cabo por un tiempo total de una hora midiendo el cambio en la absorbancia ( $\lambda = 728$  nm) cada minuto y a una temperatura de 25 °C. Fue necesario utilizar concentraciones de antioxidante elevadas (1000, 1100, 1200 y 1300  $\mu$ M) con el fin de observar la aparición del tiempo lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$ , sin embargo, a medida que aumentaba la concentración de ácido gálico, la absorbancia incrementaba; después de una hora, la absorbancia detectada al utilizar 1300  $\mu$ M de ácido gálico era 1.4 veces mayor a la registrada con 1000  $\mu$ M de antioxidante. La lacasa de DeniLite IIS presentó un pH óptimo de 3, sin embargo los resultados anteriores pueden indicar que la enzima no presentó una buena estabilidad en dichas condiciones, más aún, parece ser que nuevamente, se favoreció la aparición de un efecto prooxidante por parte del ácido gálico, ya

que a las concentraciones de antioxidante analizadas no se logró obtener el tiempo lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$ .

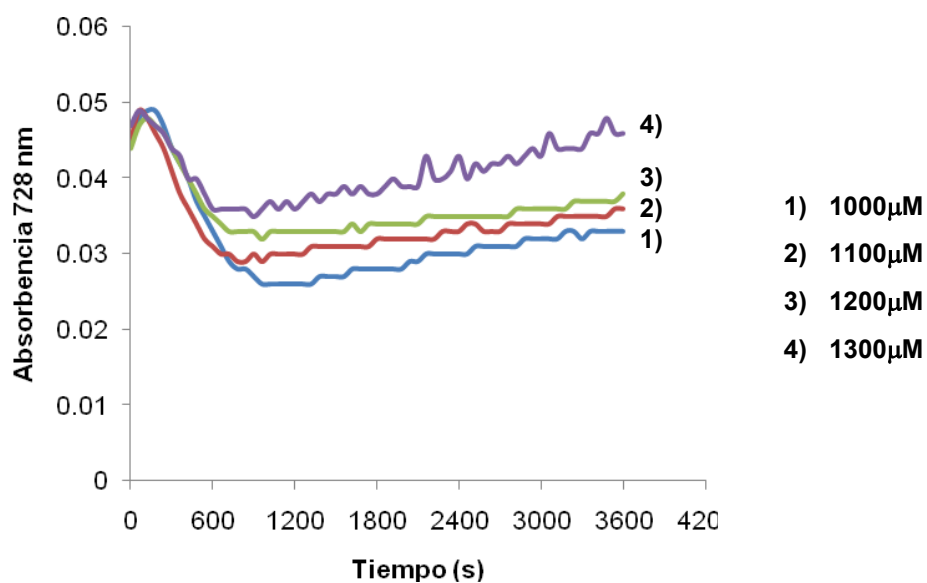


Figura 29. Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS  $1.07\pm 0.05$  U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3 en presencia de ácido gálico.

Las cinéticas correspondientes a DeniLite IIS  $0.59\pm 0.06$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M a pH 4 se muestran en la Figura 30. Se determinó el efecto del ácido gálico en un intervalo de concentración 500 a 900  $\mu$ M.

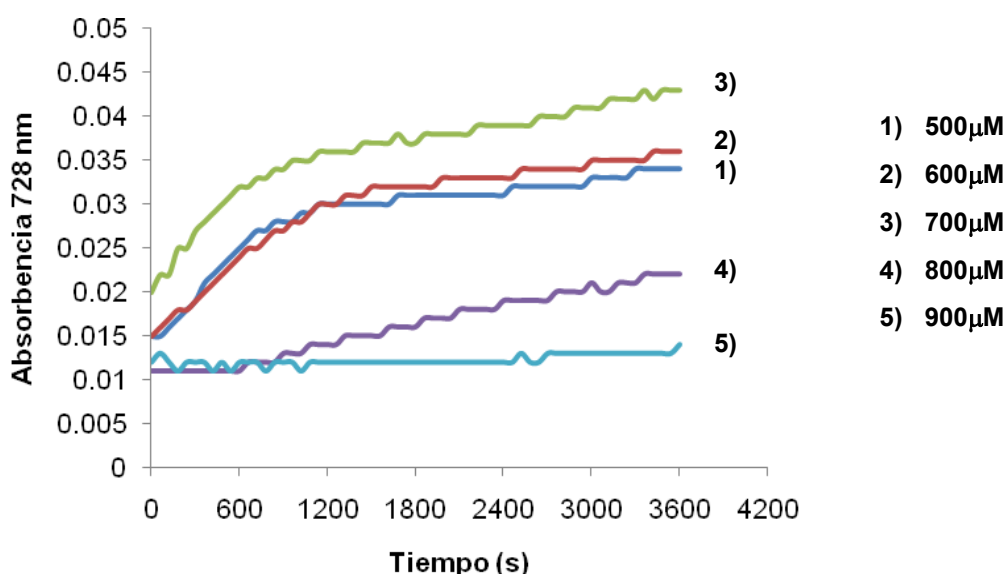


Figura 30. Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS  $0.59 \pm 0.06$  U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido gálico.

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Al utilizar concentraciones menores a 800  $\mu\text{M}$  de antioxidante se observó nuevamente un aumento en la formación de radicales  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Sin embargo, al aumentar la concentración de ácido gálico de 800 a 900  $\mu\text{M}$ , no se apreció de manera considerable la aparición del radical después de una hora de reacción, lo cual resultó poco funcional, puesto que se buscaba desarrollar un método rápido y sencillo para evaluar la capacidad antioxidante de extractos hidrosolubles de alimentos.

Los resultados anteriores mostraron que las condiciones de pH y concentración de lacasa utilizadas favorecen la acción prooxidante más que antioxidante del ácido gálico. Young y Woodside (2001) señalaron que bajo ciertas circunstancias algunos antioxidantes pueden actuar en forma inversa, es decir, como sustancias prooxidantes que paradójicamente ayudan a que se produzca un mayor daño oxidativo. El  $\beta$ -caroteno se autooxida y exhibe un



comportamiento prooxidante cuando las concentraciones de oxígeno son elevadas (Burton e Ingold, 1984).

Las condiciones que permitieron obtener los tiempos lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  al utilizar ácido gálico como antioxidante en el sistema  $ABTS/lacasa$  de DeniLite IIS fueron: disolución de DeniLite IIS  $0.06 \pm 0.001$  U/mL en presencia de  $ABTS$   $0.5$  mM en amortiguador de acetatos  $0.1$  M pH 4 a  $25$  °C. Para encontrar los tiempos lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  se utilizaron concentraciones de ácido gálico  $80$ ,  $100$ ,  $120$ ,  $140$  y  $160$   $\mu$ M (Figura 31). El tiempo lag de formación de  $ABTS^{\bullet+}$  aumentaba a medida que se incrementaban las concentraciones de ácido gálico, llegando a ser de  $35$  min ( $2100$  s) para  $160$   $\mu$ M de antioxidante (Cuadro VIII).

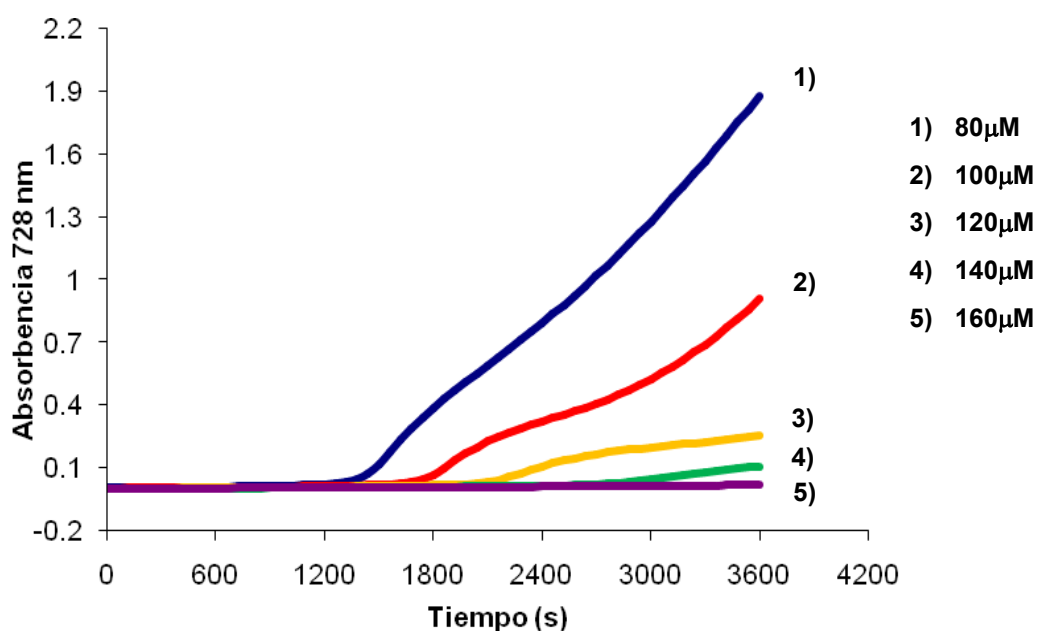


Figura 31. Cinéticas de respuesta a  $25$  °C de disolución de DeniLite IIS  $0.06 \pm 0.001$  U/mL y de  $ABTS$   $0.5$  mM en amortiguador de acetatos  $0.1$  M pH 4 en presencia de ácido gálico.

Cuadro VIII. Tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS empleando diferentes concentraciones de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo lag (s)
80	480
100	840
120	1320
140	1680
160	2100

En el Cuadro IX se presenta un resumen del efecto del ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS al utilizar diferentes combinaciones de pH y concentración de enzima.

Cuadro IX. Efecto del ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS.

pH	Concentración de DeniLite IIS (U/mL)	Efecto del ácido gálico
2	0.003 $\pm$ 0.0007	Prooxidante
2	0.110 $\pm$ 0.01	Prooxidante
3	1.07 $\pm$ 0.05	Prooxidante
4	0.59 $\pm$ 0.06	Prooxidante
4	0.06 $\pm$ 0.001	Antioxidante

Aún cuando la enzima no presentó la máxima actividad a pH 4, fue mucho más estable, además, bajo dichas condiciones, se impidió el efecto prooxidante por parte del ácido gálico de manera que se logró observar el

tiempo lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$ , está característica es de gran interés, puesto que permitirá desarrollar y optimizar un método para evaluar la capacidad antioxidante de muestras líquidas de alimentos, empleando el producto DeniLite IIS en su forma comercial sin necesidad de aislamiento y purificación de la enzima lacasa (Soares *et al.*, 2001; Solís-Oba *et al.*, 2005).

Una vez que se encontraron las condiciones de pH y concentración de DeniLite IIS que permitieron obtener los tiempos lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  utilizando ácido gálico como antioxidante, se evaluó el efecto de dos antioxidantes adicionales: ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico.

Las concentraciones de ácido ferúlico que permitieron obtener tiempos lag de formación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  fueron: 160, 170, 175, 180 y 185  $\mu$ M. La mezcla de reacción contenía  $0.06 \pm 0.0007$  U/mL de DeniLite IIS, ABTS 0.5 mM y ácido ferúlico disueltos en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.

La respuesta para el ácido ferúlico fue favorable, ya que los tiempos lag de formación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  aumentaban a medida que se incrementaba la concentración de dicho antioxidante en la mezcla de reacción (Figura 32).

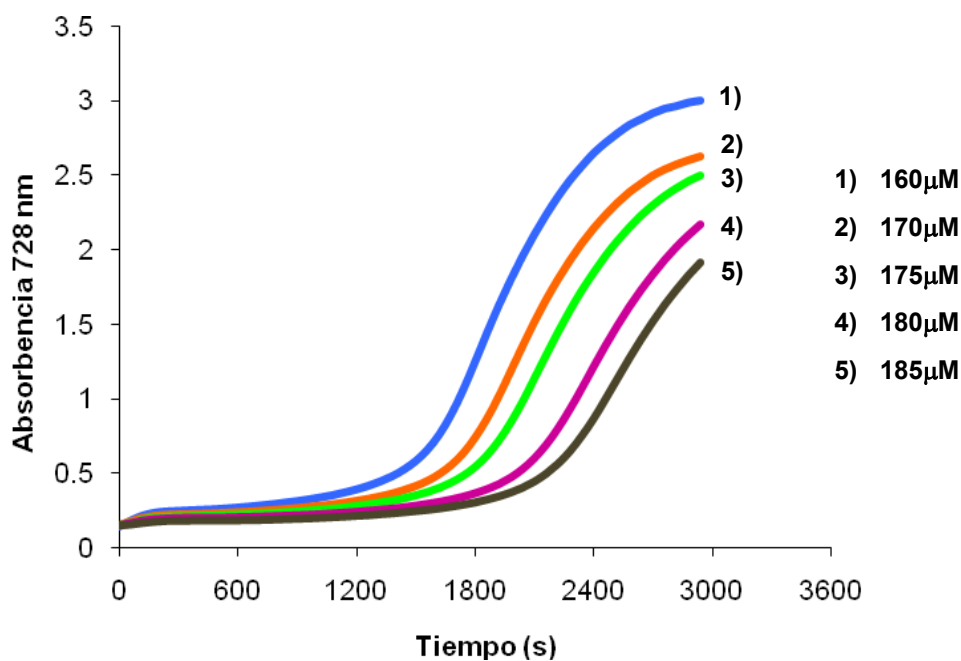


Figura 32. Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS  $0.06 \pm 0.0007$  U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido ferúlico.

Para este caso, al utilizar 185  $\mu\text{M}$  de ácido ferúlico se obtuvo un tiempo lag de 29 min equivalente a 1740 s (Cuadro X); comparado con el ácido gálico, fue necesario utilizar 1.156 veces más ácido ferúlico para obtener un tiempo lag 17% menor al logrado con 160  $\mu\text{M}$  de ácido gálico.

Cuadro X. Tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS empleando diferentes concentraciones de ácido ferúlico.

Concentración de ácido ferúlico ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo lag (s)
160	780
170	1140
175	1320
180	1560
185	1740

El ácido ferúlico es un compuesto fenilpropanoide monofenólico que se encuentra de manera natural en las plantas y en productos como salvado de arroz, el té verde y los granos de café (Maurya *et al.*, 2005). Este compuesto ha sido reconocido como un potente antioxidante que interactúa con intermediarios prooxidantes al actuar como un sustrato de “sacrificio”. Como resultado de la neutralización de radicales libres, el ácido ferúlico forma inmediatamente un radical fenoxi estabilizado por resonancia (Lin *et al.*, 2005).

Por otro lado, las condiciones que permitieron obtener los tiempos lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> al utilizar ácido L-(+)-ascórbico como antioxidante en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS fueron: disolución de  $0.07 \pm 0.0008$  U/mL de DeniLite IIS en presencia de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C (Figura 33).

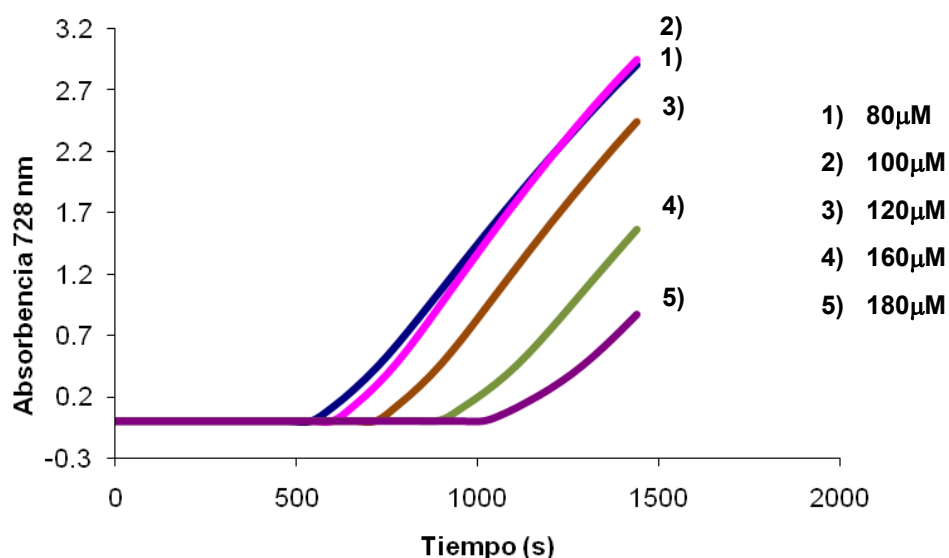


Figura 33. Cinéticas de respuesta a 25 °C de disolución de DeniLite IIS  $0.07\pm 0.0008$  U/mL y de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido L-(+)-ascórbico.

Para este caso, fue necesario utilizar concentraciones de antioxidante de: 80, 100, 120, 160 y 180  $\mu\text{M}$  (Cuadro XI). Al igual en que los casos anteriores, se comprobó que el ácido L-(+)-ascórbico produce tiempos lag de formación del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Sin embargo, los tiempos lag obtenidos fueron menores comparados con los obtenidos al utilizar ácido gálico y ácido ferúlico, respectivamente, ya que al utilizar 180  $\mu\text{M}$  de antioxidante se obtuvo un tiempo lag de 17 min (1020 s).

Cuadro XI. Tiempo lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS empleando diferentes concentraciones de ácido L-(+)-ascórbico.

Concentración de ácido L-(+)-ascórbico ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo lag (s)
80	540
100	600
120	720
160	900
180	1020

La vitamina C ( $AscH^-$ ) es uno de los antioxidantes solubles en agua más importantes. Schofield (2007) menciona que es más efectiva para combatir a los radicales libres en el citosol. La oxidación vía un electrón de la vitamina C produce un radical ascorbato ( $Asc^{\bullet}$ ) estabilizado por resonancia, que se utiliza ampliamente como un indicador de la actividad de radicales libres (Burkitt, 2004). El ácido L-(+)-ascórbico o vitamina C ha sido utilizado con frecuencia como antioxidante estándar para neutralizar a los radicales  $ABTS^{\bullet+}$  (Kuskoski *et al.*, 2005; Ing-Chien *et al.*, 2004).

El sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS permitió generar radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  que pueden ser inhibidos por cierto tiempo, denominado tiempo lag, al estar presentes determinadas concentraciones de antioxidante. Los tiempos lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  dependen de la concentración y el tipo de antioxidante utilizado en la mezcla de reacción. Por lo tanto, aún cuando se utilicen las mismas condiciones de pH y concentración de DeniLite IIS, se obtendrán respuestas diferentes de tiempo lag al utilizar distintos antioxidantes.

#### 6.4.2 Evaluación del sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*.

Al igual que en el sistema ABTS/lacasa utilizando DeniLite IIS como fuente enzimática, las cinéticas para evaluar el efecto del pH y la concentración de enzima lacasa de *Rhus vernicifera* en el tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> se realizaron siguiendo las combinaciones de pH y concentración de lacasa generadas en el diseño factorial. El tiempo total de las cinéticas fue de una hora, midiendo el cambio en la absorbencia cada minuto a una longitud de onda de 728 nm y a 25 °C.

En la Figura 34 se muestran los resultados obtenidos para la disolución de  $0.081 \pm 0.003$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico 5, 7, 10, 15 y 25  $\mu$ M. Bajo estas condiciones, se obtuvieron tiempos lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> que incrementaban a medida que aumentaba la concentración de ácido gálico, llegando a obtener un tiempo lag de 19 min (1140 s) al utilizar 25  $\mu$ M de antioxidante.

Al tener una mezcla de reacción de disolución de  $0.05 \pm 0.001$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5, se obtuvieron nuevamente tiempos lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>, al emplear ácido gálico en concentraciones 5, 7, 10, 15 y 20  $\mu$ M (Figura 35). Sin embargo, bajo estas condiciones a una concentración de 5  $\mu$ M de ácido gálico se obtuvo un tiempo lag de 10 min (600 s), 50% más tiempo de inhibición en la formación del radical, que el obtenido para  $0.081 \pm 0.003$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 5 que mostró un tiempo lag de 5 min (300 s), utilizando la misma concentración de antioxidante. Asimismo, al probar una concentración de ácido gálico 20  $\mu$ M se obtuvo un tiempo lag de 24 min (1440 s).



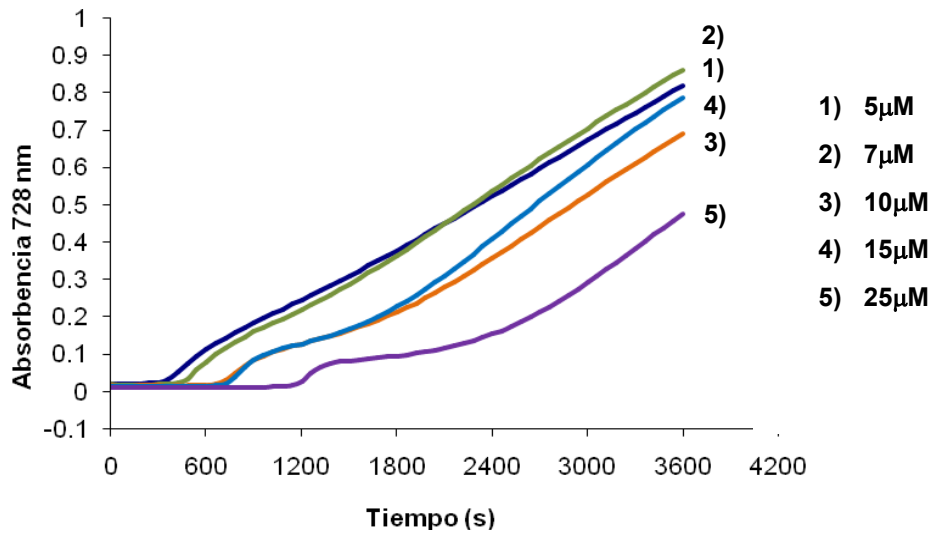


Figura 34. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.081 \pm 0.003$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico.

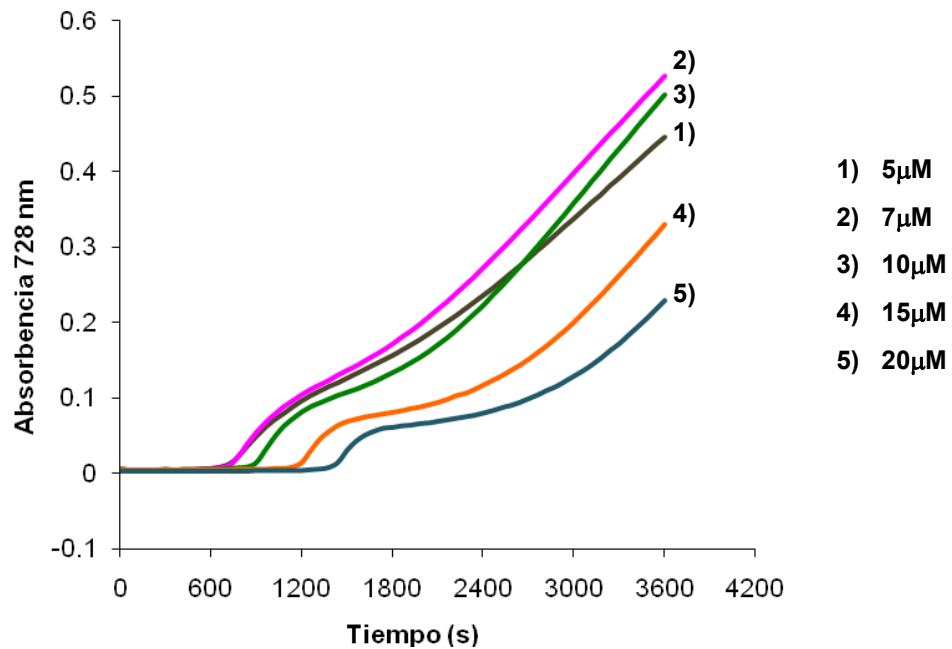


Figura 35. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.05 \pm 0.001$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico.

En el caso de las cinéticas que se llevaron a cabo a un pH de 3, en las cuales se tenía una mezcla de reacción de  $0.38 \pm 0.006$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera*, ABTS 0.5 mM y ácido gálico 15, 80, 200, 300 y 500  $\mu$ M, respectivamente, se observó que al utilizar 15 y 80  $\mu$ M de antioxidante no se obtuvieron tiempos lag de formación de radicales libres ABTS $^{\bullet+}$ . Debido a lo anterior, fue necesario aumentar la concentración de ácido gálico a concentraciones de 200, 300 y 500  $\mu$ M. Aún cuando dichas concentraciones de antioxidante mostraron tiempos lag, éstos se prolongan por más de una hora, lo cual resultó poco conveniente para el sistema ABTS/lacasa (Figura 36).

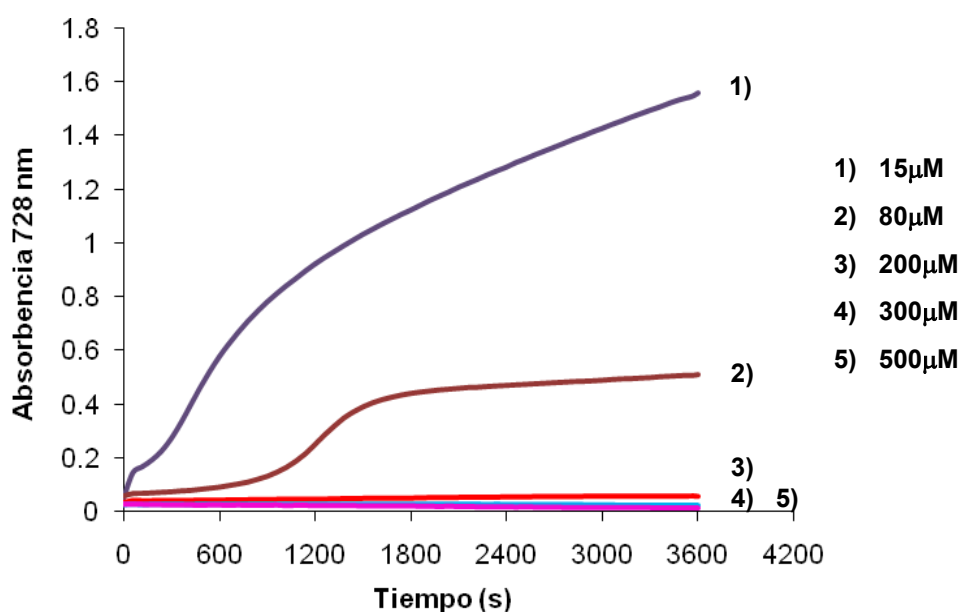


Figura 36. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.38 \pm 0.006$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3 en presencia de ácido gálico.

Las cinéticas en las que se utilizaron mezclas de reacción de: disolución de  $0.34 \pm 0.02$  U/mL de lacasa, ABTS 0.5 mM y ácido gálico 5 y 15  $\mu$ M, respectivamente, en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3, no

mostraron tiempos lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$ , pero al incrementar las concentraciones de antioxidante a 50, 80 y 100  $\mu M$ , se obtuvo la misma tendencia que en las cinéticas que utilizaban  $0.38 \pm 0.006$  U/mL de lacasa (Figura 37).

Al incrementar la actividad de la disolución de enzima lacasa de  $0.34 \pm 0.02$  U/mL a  $0.38 \pm 0.006$  U/mL en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3, fue necesario aumentar 4, 3.75 y 5 veces más la concentración de antioxidante, con respecto a las concentraciones utilizadas en el caso de  $0.34 \pm 0.02$  U/mL, para obtener tiempos lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$ .

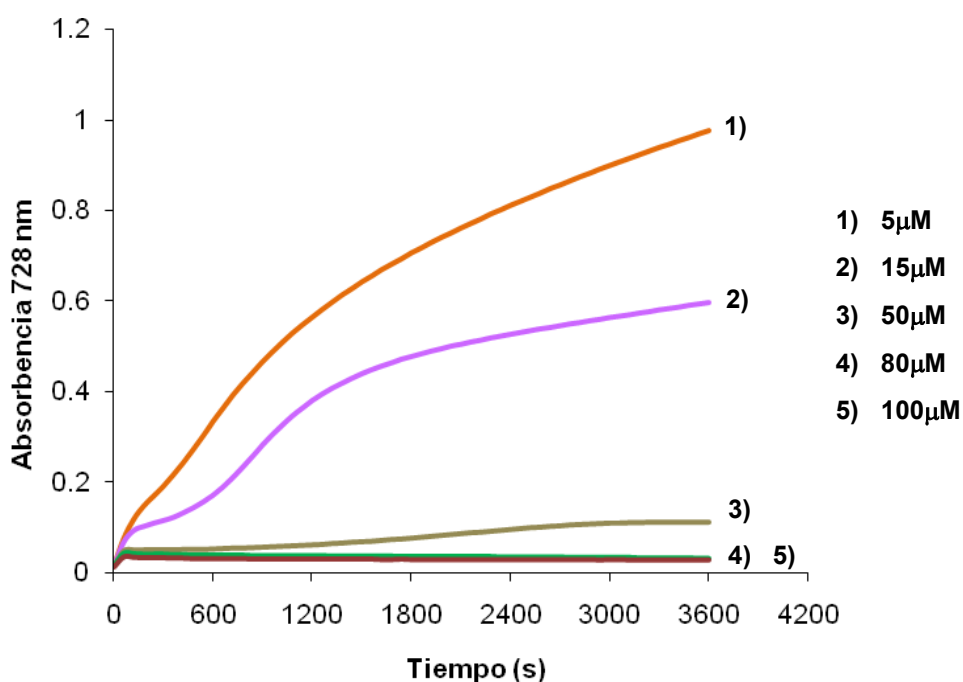


Figura 37. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.34 \pm 0.02$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador glicina-HCl 0.1 M pH 3 en presencia de ácido gálico.

Con base en lo obtenido, se descartaron las condiciones anteriores para la obtención de tiempos lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  usando ácido gálico como antioxidante.

Al igual que en sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS, se observó que al utilizar un pH de 3 en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*, el ácido gálico se comportó como un prooxidante. Los valores de pH tienen un efecto importante en la capacidad reductora de los antioxidantes. Bajo condiciones ácidas la capacidad reductora puede ser suprimida, debido a la protonación del compuesto antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

En la Figura 38 se pueden observar las cinéticas de disolución de  $0.16\pm 0.004$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido gálico 15, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ M.

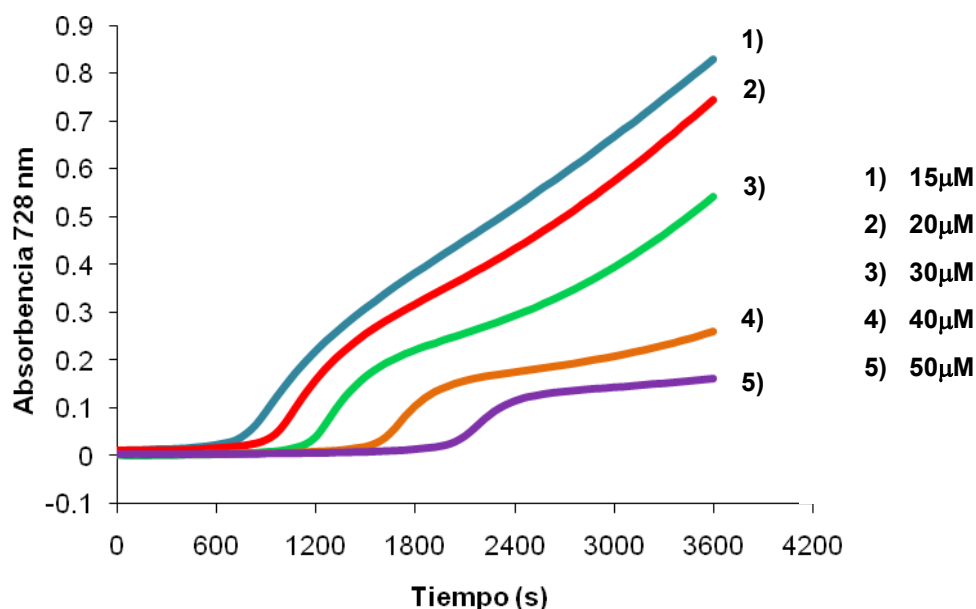


Figura 38. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.16\pm 0.004$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido gálico.

Bajo estas condiciones, el tiempo lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  aumentaba proporcionalmente con la concentración de antioxidante, llegando a ser de 31 min (1860 s) al utilizar 50  $\mu$ M de ácido gálico (Cuadro XII). El tiempo lag en este sistema fue sólo un minuto mayor al que se obtuvo en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS al utilizar una concentración de antioxidante 3.2 veces mayor (160  $\mu$ M).

Cuadro XII. Tiempo lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* empleando diferentes concentraciones de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico ( $\mu$ M)	Tiempo lag (s)
15	420
20	660
30	1080
40	1440
50	1860

En el Cuadro XIII se presenta un resumen del efecto del ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* al utilizar diferentes combinaciones de pH y concentración de enzima.

Cuadro XIII. Efecto del ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*.

pH	Concentración de lacasa de <i>Rhus vernicifera</i> (U/mL)	Efecto del ácido gálico
3	0.38±0.006	Prooxidante
3	0.34±0.02	Prooxidante
4	0.16±0.004	Antioxidante
5	0.081±0.003	Antioxidante
5	0.05±0.001	Antioxidante

A pesar de que las disoluciones de 0.081±0.003 U/mL de lacasa y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico 5, 7, 10, 15 y 25  $\mu$ M y 0.05±0.001 U/mL de lacasa y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 5 en presencia de ácido gálico 5, 7, 10, 15 y 20  $\mu$ M, permitieron observar tiempos lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>, éstas no fueron establecidas como las mejores condiciones para la obtención de tiempos lag de formación de radicales, puesto que la enzima mostró la mayor actividad a un pH óptimo de 4.

Al igual que en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS, una vez que se establecieron las condiciones de pH y concentración de lacasa de *Rhus vernicifera* que mostraron la mejor respuesta de tiempos lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup>, se evaluó el efecto del ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico, respectivamente, en el tiempo lag de formación del radical.

Las respuestas del tiempo lag de formación del radical ABTS<sup>•+</sup> al utilizar 0.18±0.007 U/mL de lacasa, ABTS 0.5 mM y concentraciones de ácido ferúlico 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu$ M en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4

(Figura 39) fueron: 17, 23, 30, 37 y 46 min (1020, 1380, 1800, 2220 y 2760 s) respectivamente (Cuadro XIV).

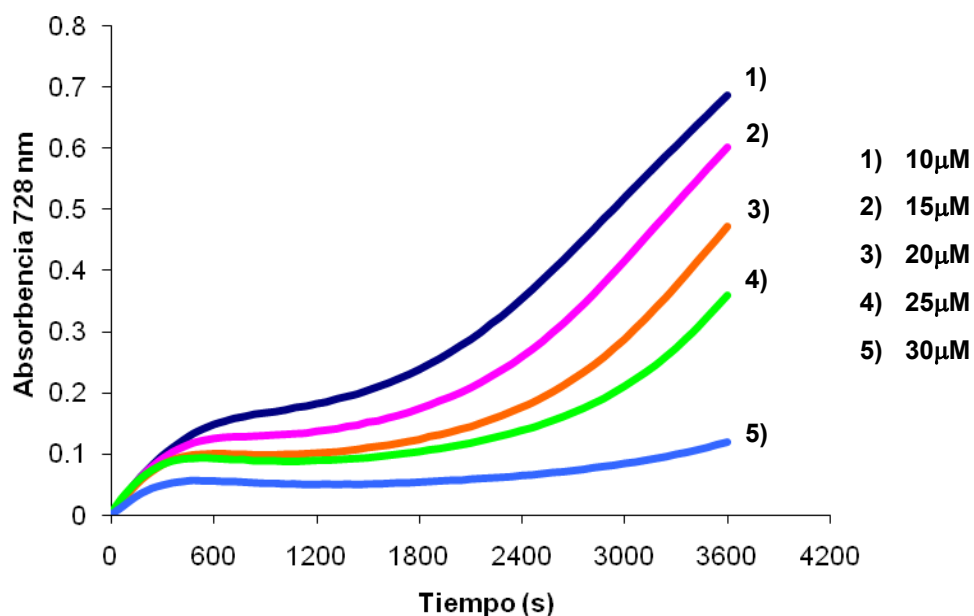


Figura 39. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.18 \pm 0.007$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido ferúlico.

Comparado con el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS, se requirió de una cantidad mucho menor de antioxidante para obtener tiempos lag prolongados.

Cuadro XIV. Tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* empleando diferentes concentraciones de ácido ferúlico.

Concentración de ácido ferúlico ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo lag (s)
10	1020
15	1380
20	1800
25	2220
30	2760

Lo anterior pudo deberse probablemente, a que además de la lacasa, el compuesto ácido fenotiazin-10-propiónico presente como parte de la formulación del producto DeniLite IIS (Soares *et al.*, 2001) ayude a producir una mayor cantidad de radicales ABTS<sup>•+</sup> y por tanto se requiera de una concentración mayor de antioxidante para obtener los tiempos lag de formación de radicales en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS comparado con el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*.

Las concentraciones de ácido L-(+)-ascórbico que permitieron obtener tiempos lag de formación del radical ABTS<sup>•+</sup> en este sistema fueron: 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$  (Figura 40). La mezcla de reacción contenía  $0.17 \pm 0.014$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera*, ABTS 0.5 mM y antioxidante disueltos en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4.



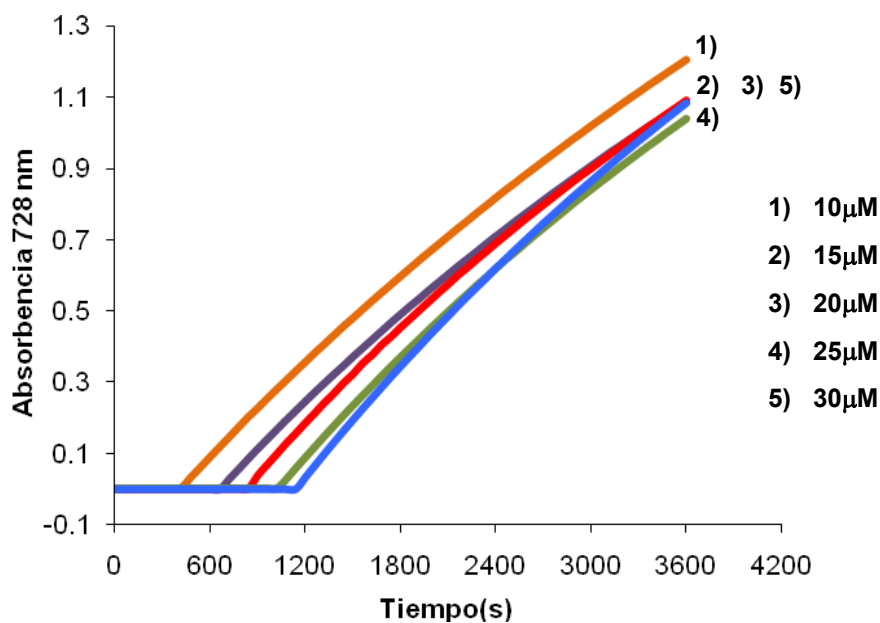


Figura 40. Cinéticas a 25 °C de disolución de  $0.17 \pm 0.014$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 en presencia de ácido L-(+)-ascórbico.

Aún cuando se utilizaron las mismas concentraciones que en el caso de ácido ferúlico, se observó que los tiempos lag en presencia de ácido L-(+)-ascórbico son menores. Al adicionar 30  $\mu$ M de ácido L-(+)-ascórbico se obtuvo un tiempo lag de 19 min (1140 s) el cual, es 2.4 veces menor al obtenido con la misma concentración de ácido ferúlico (Cuadro XV).

Cuadro XV. Tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* empleando diferentes concentraciones de ácido L-(+)-ascórbico.

Concentración de ácido L-(+)-ascórbico (μM)	Tiempo lag (s)
10	420
15	660
20	840
25	1020
30	1140

Al igual que el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS, el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* permitió generar radicales libres ABTS<sup>•+</sup> que pudieron ser inhibidos por determinadas concentraciones de diferentes compuestos antioxidantes. El ácido ferúlico y el ácido gálico mostraron un poder antioxidante mayor en los ensayos *in vitro* en comparación con el ácido L-(+)-ascórbico, si tomamos en cuenta los tiempos lag obtenidos para cada uno de los casos. Wang *et al.* (1996) sugieren que los polifenoles presentan una actividad antioxidante mayor en comparación con los antioxidantes “comunes” (ácido ascórbico, tocoferol, etcétera) asumiendo que más del 80% de la actividad antioxidante total de las frutas se debe a compuestos diferentes a la vitamina E, C y al β-caroteno.

Los sistemas desarrollados permitieron establecer diferencias entre antioxidantes, ya que aún cuando se utilizaron concentraciones similares de determinados compuestos, se obtuvieron respuestas diferentes. Los resultados obtenidos para ambos sistemas demuestran que los tiempos lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> dependen no sólo de la concentración y el

tipo de antioxidante utilizado en la mezcla de reacción, sino también de la fuente de lacasa.

### 6.5 Evaluación del intervalo de linealidad de una curva estándar, empleando ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*.

Al graficar los tiempos lag obtenidos en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* contra la concentración de antioxidante (ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-(+)-ascórbico, respectivamente), se obtuvieron curvas que se ajustaron al modelo  $y=mx+b$  (Figura 41 y Figura 42). Se encontró que los coeficientes de correlación de los datos son muy cercanos a la unidad para todos los casos. Las condiciones que permitieron obtener dicha respuesta fueron: (a)  $0.063\pm 0.006$  U/mL de DeniLite IIS y ABTS 0.5 mM y (b)  $0.17\pm 0.012$  U/mL de lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.

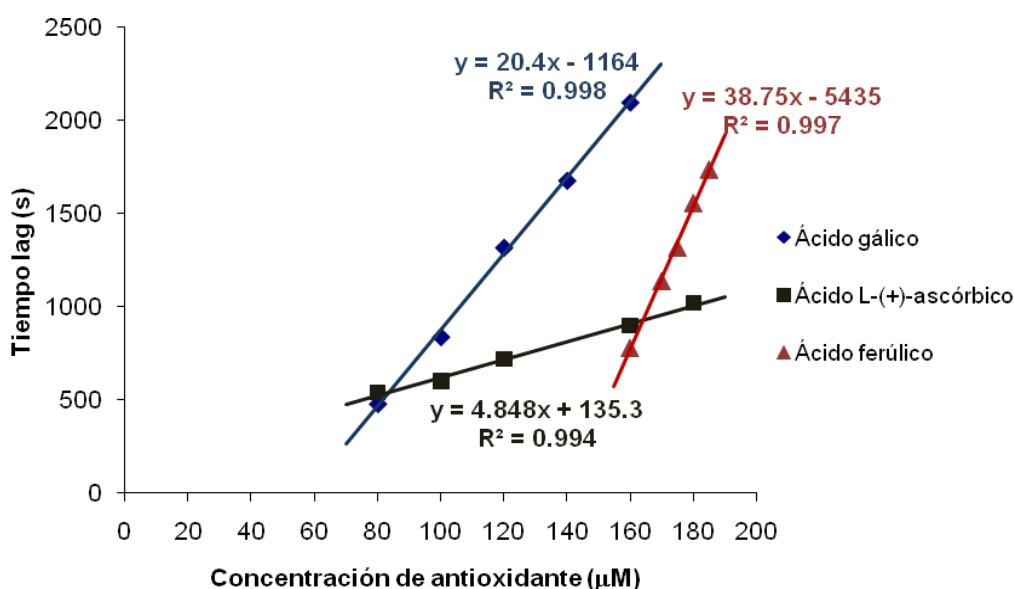


Figura 41. Curvas de correlación entre concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>••</sup> en el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS.

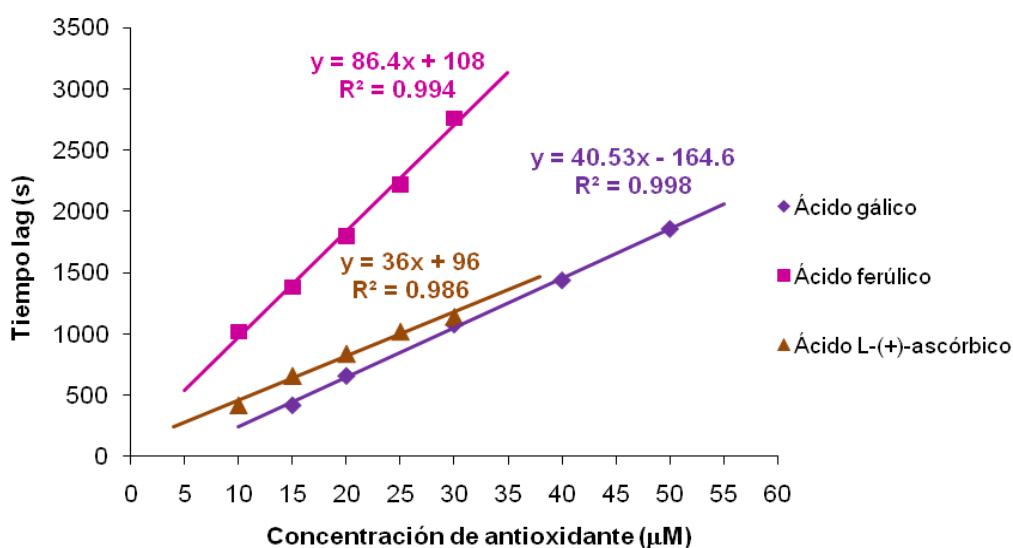


Figura 42. Curvas de correlación entre concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  en el sistema  $ABTS/lacasa$  de *Rhus vernicifera*.

El orden decreciente del valor de la pendientes de los compuestos antioxidantes utilizados tanto en el sistema  $ABTS/lacasa$  de DeniLite IIS, como en el sistema  $ABTS/lacasa$  de *Rhus vernicifera* fue: ácido ferúlico > ácido gálico > ácido L-(+)-ascórbico. Lo anterior demuestra que aun cuando se tienen dos sistemas diferentes en cuanto a la fuente y concentración de lacasa, ambos sistemas permiten obtener la misma respuesta en cuanto a la diferenciación de los compuestos antioxidantes empleados para obtener los tiempos lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$ .

Los principales antioxidantes utilizados para combatir a las especies radicales son: la vitamina E, la vitamina C y los compuestos fenólicos. La capacidad antioxidante de muestras que contienen antioxidantes ha sido expresada con frecuencia en equivalentes trolox (análogo de la vitamina E) y equivalentes de ácido gálico (Huang *et al.*, 2005). Por otro lado Ing-Chien *et*

*al.* (2004) y Kuskoski *et al.* (2005) expresan la capacidad antioxidante en equivalentes de vitamina C.

La elección de los antioxidantes ácido gálico, ácido ferúlico y ácido L-ascórbico para la obtención de tiempos lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> se debió a que estos compuestos han demostrado poseer un potencial antioxidante elevado. El ácido gálico y el ácido ferúlico son compuestos polifenólicos presentes en una gran cantidad de alimentos como el té verde, café, frutas, etcétera (Sagin y Sozmen, 2004) que ayudan a combatir a los radicales libres formados en el organismo. Frankel y Meyer (2000) mencionan que los fenoles son potentes compuestos antioxidantes capaces de neutralizar rápidamente radicales peroxil lipídicos. Las relaciones entre la actividad de las estructuras de los antioxidantes fenólicos (tocoferoles, ácido gálico, ésteres de ácido gálico, flavonoles polifenólicos, flavonoides y ácido fenólicos) para neutralizar radicales, involucra la donación de un hidrógeno fenólico así como, la estabilización del radical antioxidante resultante por deslocalización, unión intramolecular de hidrógenos o por una subsecuente oxidación. En el caso de los antioxidantes fenólicos la pérdida de un hidrógeno ocurre por donación de un electrón, seguida de una desprotonación.

Por otro lado, la vitamina C es una vitamina soluble esencial que se distribuye rápidamente por todos los tejidos. *In vivo* actúa como un antioxidante que neutraliza especies reactivas del oxígeno. El ascorbato coopera con la vitamina E, regenerando el  $\alpha$ -tocoferol a partir de radicales  $\alpha$ -tocoferil formados en las membranas y en las lipoproteínas (Sagin y Sozmen, 2004).

Con base en lo anterior, se propone utilizar al sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS y al sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* como métodos para evaluar la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos,

expresada como equivalentes de ácido gálico, ácido ferúlico o ácido L-(+)-ascórbico.

### 6.6 Método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP.

Los sistemas ABTS/lacasa desarrollados pueden ser utilizados como métodos para evaluar la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos. Sin embargo, resultó interesante comparar la respuesta de estos métodos con otro método enzimático reportado previamente, es por ello que se montó el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP (Arnao *et al.*, 1996; Ing-Chien *et al.*, 2004), que trabaja a pH 7. Es importante mencionar que se utilizaron los mismos antioxidantes que se probaron en los sistemas ABTS/lacasa.

Las curvas de concentración de antioxidante contra tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> (Figura 43) se ajustaron a una recta y mostraron coeficientes de correlación cercanos a la unidad.

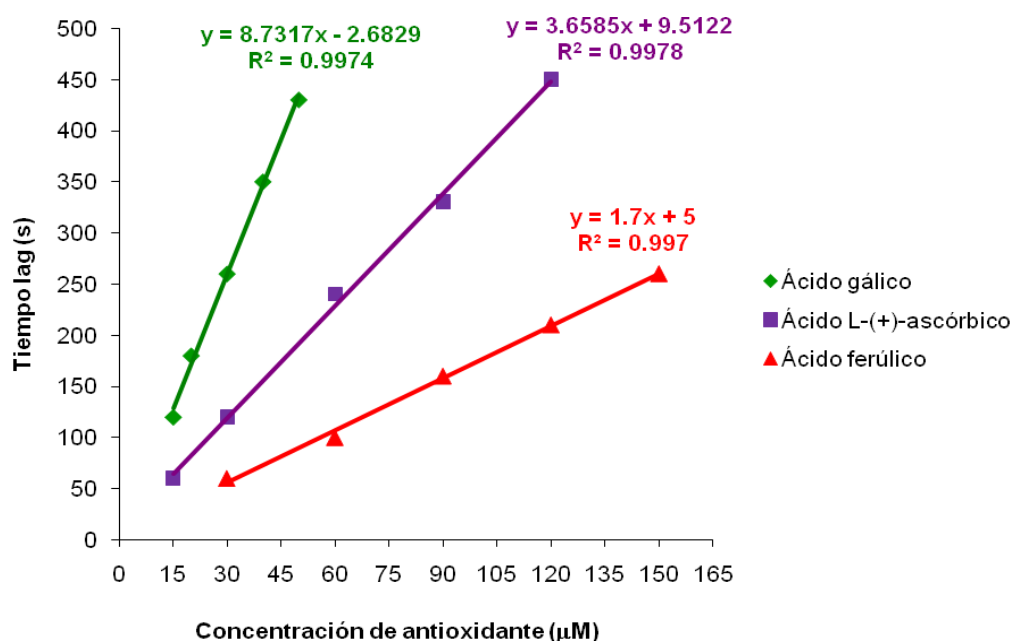


Figura 43. Curvas de correlación entre concentración de antioxidante versus tiempo lag de formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> en el sistema ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP.

En este caso, el ácido gálico y el ácido ascórbico mostraron un poder antioxidante mayor, ya que los tiempos lag obtenidos fueron mayores con menores concentraciones de antioxidante, comparados con los tiempos lag obtenidos para las distintas concentraciones de ácido ferúlico.

Ozgen *et al.* (2006) mencionan que las cinéticas de oxidación de los antioxidantes usados como estándares varían considerablemente en función al método utilizado para evaluar la capacidad antioxidante. El ácido clorogénico y caféico muestran un comportamiento muy similar en las pruebas ABTS, DPPH y FRAP, pero muestran perfiles de oxidación muy diferentes en cuanto al método empleado.

### **6.7 Evaluación de la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos.**

La capacidad antioxidante total de las muestras: jugo de naranja fresco y antioxidantes extraídos de residuos agroindustriales (olote de maíz y rastrojo de amaranto), se evaluó mediante los métodos ABTS/lacasa de DeniLite IIS, ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP. En el Cuadro XVI se muestran los resultados de la capacidad antioxidante total (valor de la media  $\pm$  DE, con n=3), expresados como microgramos equivalentes de ácido gálico, ferúlico o L-(+)-ascórbico por gramo o por litro de muestra. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico Minitab 14, aplicando ANOVA de una vía seguido del método de comparaciones múltiples de Tukey, con el objetivo de determinar las diferencias entre las medias. Los valores P<0.05 fueron considerados significativos.

Cuadro XVI. Capacidad antioxidante total del extracto hidrosoluble en muestras de alimentos.

Muestra	Método								
	ABTS/R.v. <sup>1</sup> (µg/g o µg/L)			ABTS/DIIS <sup>2</sup> (µg/g o µg/L)			ABTS/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP (µg/g o µg/L)		
	AG <sup>3</sup>	AF <sup>4</sup>	L-asc <sup>5</sup>	AG	AF	L-asc	AG	AF	L-asc
Olote de maíz	45.5±2.2 <sup>a</sup>	19.8±1.2 <sup>a</sup>	43.4±2.5 <sup>a</sup>	126.6±2.2 <sup>a</sup>	236.6±1.3 <sup>a</sup>	197.5±9.4 <sup>a</sup>	24.7±0.8 <sup>a</sup>	138.5±4.9 <sup>a</sup>	56.7±2.1 <sup>a</sup>
Rastrojo de amaranto	29.1±2.9 <sup>a</sup>	11±1.6 <sup>a</sup>	24.4±3.4 <sup>a</sup>	107.8±2.2 <sup>a</sup>	225.3±1.3 <sup>a</sup>	115.7±9.4 <sup>a</sup>	14±1.7 <sup>b</sup>	75.7±9.9 <sup>b</sup>	30.3±4.2 <sup>b</sup>
Jugo de naranja fresco	340.6±22.2 <sup>b</sup>	155.5±11.9 <sup>b</sup>	341±25.8 <sup>b</sup>	852.6±12.7 <sup>b</sup>	1454.3±7.6 <sup>b</sup>	1638±55.4 <sup>b</sup>	176.6±5.0 <sup>c</sup>	996.9±29 <sup>c</sup>	410.6±12.2 <sup>c</sup>

Los valores en la tabla representan la media ± DE con n=3. Las medias de la capacidad antioxidante total con letras distintas en cada una de las columnas son significativamente diferentes con una P<0.05.

<sup>1</sup> ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera*

<sup>2</sup> ABTS/lacasa de DeniLite IIS (*Myceliophthora thermophila* clonada en *Aspergillus oryzae*)

<sup>3</sup> Ácido gálico

<sup>4</sup> Ácido ferúlico

<sup>5</sup> Ácido L-(+)-ascórbico



La muestra de jugo de naranja fresco mostró la mayor capacidad antioxidante total expresada como equivalentes de ácido gálico, ferúlico o L-(+)-ascórbico al ser evaluada por los tres métodos ( $P < 0.05$ ), seguida por el olote de maíz y finalmente por el rastrojo de amaranto. Los valores de capacidad antioxidante de rastrojo de amaranto y olote de maíz evaluados por los métodos ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* y expresados como equivalentes de ácido gálico, ferúlico ó L-(+)-ascórbico, no mostraron diferencias significativas al aplicar el método de comparaciones múltiples de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

Aún cuando los valores de capacidad antioxidante total de las muestras analizadas por cada uno de los métodos y para cada uno de los antioxidantes presentaron diferencias, se observó que se tienen las mismas tendencias en cuanto a la capacidad antioxidante total, de manera que se pudo determinar claramente qué muestra es la que poseía un potencial antioxidante mayor. El orden decreciente de la capacidad antioxidante total de las muestras líquidas de alimentos determinada por los métodos ABTS/lacasa de DeniLite IIS, ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP fue: jugo de naranja > olote de maíz > rastrojo de amaranto.

Haruenkit *et al.* (2007) utilizaron los métodos ABTS y DPPH para evaluar la capacidad antioxidante de los frutos exóticos: durian, mangostán y fruta serpiente. Sus resultados muestran que la fruta durian posee una mayor capacidad antioxidante, seguida de la fruta serpiente y finalmente del mangostán. Los valores de capacidad antioxidante reportados difieren en función al método aplicado, sin embargo claramente se observa la tendencia en cuanto a qué fruto exótico presenta el mayor potencial antioxidante.

Reportes previos que evalúan la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos han llevado a cabo estudios comparativos utilizando diferentes métodos (Ozgen *et al.*, 2006; Kuskoski *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*,

2005; Katsube *et al.*, 2004). Los resultados muestran, al igual que en este trabajo, que los valores de capacidad antioxidante son función del método utilizado, del tipo de antioxidante y de las condiciones de pH, temperatura, tiempo de reacción y complejidad de las cinéticas de reacción en las que se lleven a cabo los ensayos (Ozgen *et al.*, 2006). Sin embargo, en dichos reportes también se observan las tendencias en cuanto al potencial antioxidante de las muestras. Prior *et al.* (2005) mencionan que la comparación de los resultados de capacidad antioxidante obtenidos por diferentes métodos no brindan mucha información debido a que no es posible observar resultados similares entre los métodos al evaluar un grupo diverso de especies botánicas, particularmente si el mecanismo de reacción de los métodos es diferente. Sin embargo, Ozgen *et al.* (2006) señalan que aplicar dos métodos diferentes para evaluar la capacidad antioxidante de muestras de frutas nos da la oportunidad de identificar variaciones en las respuestas, que de otra manera no se observarían.

Los sistemas ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* desarrollados son métodos *in vitro* que requieren de un medio de reacción a pH 4, mientras que el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP funciona a un pH de 7. Ozgen *et al.* (2006) señalan que bajar el pH de 7.4 a 4.5 en el método ABTS favorece la obtención de un medio estable de reacción para medir la capacidad antioxidante de frutos y otros productos naturales que contienen compuestos fenólicos. Un pH de reacción de 4.5 permite llevar a cabo mediciones del potencial antioxidante por periodos más largos, asegurando una buena aproximación de la capacidad antioxidante absoluta.

A pesar de que los sistemas ABTS/lacasa desarrollados funcionan a pH ácido, se comprobó que ambos sistemas mostraron la misma tendencia que el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP, el cual trabaja a un pH neutro, para determinar que muestra es la que presenta un potencial antioxidante mayor. Esto resulta de gran interés, ya que más que comparar los valores de

capacidad antioxidante obtenidos al aplicar diferentes métodos bajo diferentes condiciones, lo que se busca es precisamente, observar si con los métodos aplicados se obtienen las mismas tendencias para determinar el potencial antioxidante de una determinada muestra.

Los métodos *in vitro* que evalúan la capacidad antioxidante son útiles para determinar si un extracto o compuesto en particular es un antioxidante efectivo. La neutralización de radicales *in vitro* es sólo una prueba preliminar en la selección de antioxidantes potentes (Kaur y Geetha, 2006). Por tanto, resulta necesario usar una variedad de métodos en una variedad de condiciones diferentes con el objetivo de describir correctamente la capacidad antioxidante *in vitro* de un compuesto. Cao y Prior (1998) mencionan que resulta interesante comparar las distintas pruebas ya que aunque se obtengan valores distintos, al aplicar diferentes métodos para determinar la actividad antioxidante, se puede observar si existe una tendencia entre las muestras analizadas, en cuanto a cuál es la que presenta una capacidad antioxidante mayor. Si bien, los datos de capacidad antioxidante obtenidos de ensayos *in vitro* resultan informativos al aplicar métodos *in vivo* y estudios clínicos, es difícil extrapolar los resultados *in vitro* a una situación *in vivo* (MacDonald *et al.*, 2006). Así, cualquiera que hable de la bioactividad de una muestra basándose sólo en métodos para evaluar capacidad antioxidante como el ORAC, TEAC y FRAP estaría siendo exagerado, poco científico y fuera de contexto (Huang *et al.*, 2005).

Hasta este momento, ningún ensayo por sí solo proporciona toda la información deseada sobre la capacidad antioxidante de una muestra (Prior *et al.*, 2005). Por tanto, el contar con un método sencillo, práctico y fácil de llevar a cabo en cualquier laboratorio de investigación, que nos permita evaluar la capacidad antioxidante de extractos hidrosolubles de alimentos es importante e interesante.

Los métodos ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* son pruebas enzimáticas *in vitro*, sencillas y reproducibles que permitieron evaluar la capacidad antioxidante de muestras líquidas de alimentos sin la necesidad de equipos sofisticados, ni reactivos excesivamente costosos o poco accesibles. Estos métodos son una opción adicional al único método enzimático reportado para evaluar la capacidad antioxidante: el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP (Arnao *et al.*, 1996; Ing-Chien *et al.*, 2004). Los métodos desarrollados permitieron obtener la misma respuesta en cuanto al potencial antioxidante de una muestra comparados con dicho método, además los sistemas ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* sólo requieren de sustrato (ABTS) y enzima (lacasa) para la generación inmediata de radicales libres ABTS<sup>•+</sup> en presencia de oxígeno molecular, mientras que el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP requiere de ABTS, enzima (HRP) y peróxido de hidrógeno para la generación de radicales.

### 6.8 Perspectivas.

Los resultados de la presente tesis mostraron que los sistemas ABTS/lacasa de DeniLite IIS y ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* pueden ser utilizados como métodos para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos hidrosolubles presentes en muestras de alimentos como: jugo de naranja, olote de maíz y rastrojo de amaranto. Dichos métodos permiten diferenciar el potencial antioxidante de las muestras analizadas de la misma manera que el método ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP. Sin embargo, se requiere seguir aplicando los métodos desarrollados para estimar la capacidad antioxidante de otros alimentos diferentes a los analizados, con el objetivo de observar si este método puede ser utilizado para evaluar un intervalo amplio de muestras. Además es importante obtener una curva patrón utilizando Trolox como antioxidante de referencia, que nos permita estimar y expresar la capacidad antioxidante de las muestras analizadas, como equivalentes de Trolox, para poder contribuir con la estandarización del método ABTS.

Así mismo, resultaría interesante observar el comportamiento del sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS, realizando una purificación previa del producto, para obtener a la enzima.

Por otro lado, resulta necesario continuar con estudios que permitan establecer los mecanismos de reacción en cada uno de los sistemas, para obtener un conocimiento más profundo sobre la formación de radicales  $ABTS^{\bullet+}$  por parte de la lacasa, así como, sobre la inhibición de los mismos por efecto de los antioxidantes.

La aplicación y utilización del método *in vitro* ABTS/lacasa, es una alternativa que podría permitir a los pequeños laboratorios de investigación realizar determinaciones de capacidad antioxidante de muestras de alimentos de una forma sencilla, rápida y reproducible, ya que no se requiere de equipos sofisticados ni de reactivos poco accesibles.

Finalmente, en estudios más profundos sobre antioxidantes y su efecto en los organismos, es importante que además de la aplicación de métodos *in vitro* como el sistema ABTS/lacasa para la determinación del potencial antioxidante de determinadas muestras, se lleven a cabo pruebas *in vivo* que permitan obtener resultados concretos sobre la bioactividad de un alimento en particular.

## 7. CONCLUSIONES.

- La oxidación del ABTS por la lacasa genera radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$  que se detectan a 728 nm sin interferencia de la especie reducida, lo que permite cuantificar el radical con mayor precisión.
- Los sistemas ABTS/lacasa de DeniLite IIS o de *Rhus vernicifera* permiten observar tiempos lag de formación de radicales libres  $ABTS^{\bullet+}$ . Éstos se correlacionan con la concentración del antioxidante ajustándose al modelo  $y=mx+b$ .
- Las condiciones donde se obtuvieron los tiempos lag de formación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  para el sistema ABTS/lacasa de DeniLite IIS utilizando 3 diferentes antioxidantes a distintas concentraciones fueron:  $0.063 \pm 0.006$  U/mL y ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.
- Las condiciones donde se obtuvieron los tiempos lag de formación del radical  $ABTS^{\bullet+}$  para el sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* utilizando 3 diferentes antioxidantes a distintas concentraciones fueron:  $0.17 \pm 0.012$  U/mL de lacasa y ABTS 0.5 mM en amortiguador acetatos 0.1 M pH 4 a 25 °C.
- La respuesta del sistema ABTS/lacasa (DeniLite IIS o *Rhus vernicifera*) se puede utilizar para la evaluación de la capacidad antioxidante total de alimentos, debido a que es sensible para diferenciar el poder antioxidante de diferentes fuentes, de la misma manera como sucede en el sistema ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP que se utiliza actualmente.

- El orden decreciente de la capacidad antioxidante total de extractos hidrosolubles de alimentos determinada por los métodos ABTS/lacasa de DeniLite IIS, ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* y ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP es: jugo de naranja > olote de maíz > rastrojo de amaranto.
  
- El producto DeniLite IIS que contiene lacasa puede utilizarse en su forma comercial, para la evaluación de la capacidad antioxidante total de alimentos, aún cuando están presentes otros compuestos como el ácido fenotiazin-10-propiónico. En algunos casos sólo se requerirá de un paso previo de purificación del extracto hidrosoluble que contiene el antioxidante.
  
- El método desarrollado para la evaluación de la capacidad antioxidante total de muestras de alimentos presenta las siguientes ventajas:
  - a) La mezcla de reacción está compuesta por ABTS, lacasa (DeniLite IIS o *Rhus vernicifera*) y extracto hidrosoluble que contenga el antioxidante.
  
  - b) Es un método sencillo y reproducible que no requiere de equipo costoso.
  
  - c) Los reactivos que utiliza se encuentran disponibles en el mercado.
  
  - d) La generación del radical libre es instantánea en comparación con otros métodos químicos que requieren de hasta 16 horas de incubación.
  
  - e) Es una opción adicional al uso de la peroxidasa de rábano (HRP).

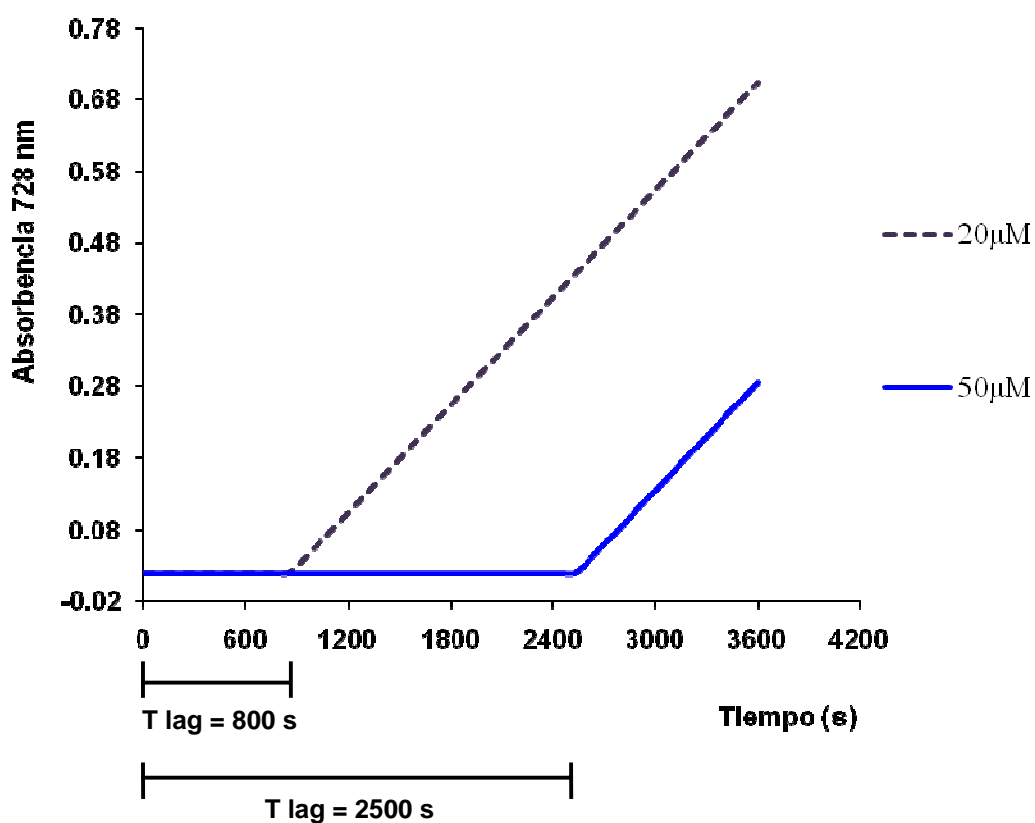
## 8. APÉNDICES.

### APÉNDICE 1

#### Tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>.

El tiempo lag es el intervalo de tiempo transcurrido entre la ocurrencia de un fenómeno y la aparición de su efecto resultante. En este caso en particular, el tiempo lag de formación de radicales libres ABTS<sup>•+</sup>, es el tiempo de retardo en la detección de radicales ABTS<sup>•+</sup> a una longitud de onda de 728 nm, debido a la presencia de determinadas concentraciones de un compuesto antioxidante.

En el siguiente gráfico se señala el tiempo lag de formación de radicales ABTS (T lag) al utilizar concentraciones 20 y 50  $\mu\text{M}$  de ácido gálico.





**APÉNDICE 2**

**Hoja del producto DeniLite II™ S**

*Product Sheet*

*Enzyme Business*

**Description** DeniLite IIS is a laccase (EC 1.10.3.2) produced by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus* microorganism.

**Product Specification** DeniLite IIS is a light grey powder product available in the following standard strength:

DeniLite IIS .....120 LAMU/g

Colour intensity is not an indication of product strength. The enzyme activity of DeniLite IIS is declared in LAMU (Laccase Units). A detailed description of the analytical method (SM 0002) is available on request.

**Application**

DeniLite IIS is a non-food-grade product intended for technical applications only.

DeniLite IIS is a ready-to-use product for indigo dye decolorization in denim finishing operations. DeniLite IIS is used when the following is sought:

- Creation of the new looks, new fashions and finishes
- Enhancement of denim abrasion, allowing for a very fast denim abrasion process
- Denim finishing with optimum fabric strength retention
- Easily controllable and reproducible dye decolorization process

DeniLite IIS is a fully formulated product including buffer and an enzyme mediator, and needs no further formulation. The phosphate adipic acid buffering system in DeniLite IIS ensures a pH 4-5 during washing. The product contains no water and it is essential that the product is not mixed with water before use.

Suggested process conditions are:

DeniLite IIS.....0.5-2% of weight of garment  
 Liquor/garment ratio.....4:1 - 20:1 (optimum 5:1 – 1:10)  
 Treatment time.....10 – 30 minutes  
 Afterwash.....Rinse (preferably hot with soap)



**Enzyme Properties**

The performance of DeniLite IIS depends on pH and temperature

**Safety**

Enzymes are proteins and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitizer individuals. Some enzymes may irritate to resist mechanical effects. However excessive mechanical wear and tear or crushing may create dust. All spills, even small spills, should be gently shoveled into plastic-lined containers. Use respiratory protection. Small spills and remains of large spills should be removed by vacuuming and flushing with water (avoid splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters. A Material Safety Data Sheet and separate material describing how to handle the product safety are available on request.

**Storage**

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature. Cool conditions are recommended. Close container after partial use to protect from humidity. When stored in closed containers at 25 °C, DeniLite IIS will maintain its declared activity for at least 3 months. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperature, may lead to a higher dosage requirement.

**CAS Number and Chemical Inventories**

DeniLite IIS is classified as a laccase, CAS No. 80498-15-3  
DeniLite IIS is listed in relevant inventories, e. g. EINECI and TSCA.

---

**Enzyme Business  
Novo Nordisk A/S  
2880 Bagsvaerd  
Denmark**

Tel. +45 4444 8888  
Fax +45 4444 1021  
Telex 37560  
enzymes@novo.dk  
www.novo.dk/enzymes



### APÉNDICE 3

#### PRODUCTIVIDAD

El presente trabajo fue presentado en el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería celebrado del 25 al 29 de Junio de 2007 en la Ciudad de Morelia, Michoacán, en la modalidad de Exposición oral.

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en el Congreso Internacional del IFT “Annual Meeting & Food Expo” celebrado del 28 de Julio al 1 de Agosto de 2007 en la Ciudad de Chicago, Illinois, en la modalidad de poster.

El curso “Evaluation of antioxidants in plants by *in vitro* and *in vivo* methods” impartido por la Dra. Shela Gorinstein de la Universidad Hebrea de Jerusalén durante el periodo del 24 al 27 de Septiembre de 2007 en la Ciudad de Durango, Durango enriqueció el contenido del presente trabajo.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

- Aikio, O. (2002). Pulmonary nitric oxide in preterm and term infants with respiratory failure. Doctoral Thesis. University of Oulu, Finland.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. y Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **90**: 7915-7922.
- Arnao, M. B., Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F. y Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry*. **236**: 225-261.
- Beckman, K. B. y Ames, B. N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*. **78**(2): 548-571.
- Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. y Xu, F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular *laccase* of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme produced in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(8): 3151-3157.
- Böhm, V. y Schlesier, K. (2004). Methods to evaluate the antioxidant activity. *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops*. **3**: 55-71.
- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. (1988). Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemical Journal*. **255**: 445-450.

- Bourbonnais, R., Leech, D. y Paice, M. G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1379**(3): 381-390.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Branchi, B., Galli, C. y Gentili, P. (2005). Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **3**: 2604-2614.
- Bräuner, E. V., Forchhammer, L., Møller, P., Simonsen, J., Glasius, M., Wåhlin, P., Raaschou-Nielsen, O. y Loft, S. (2007). Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stress-induced DNA damage. *Environmental Health Perspectives*. **115**(8): 1177-1182.
- Burkitt, M. J. (2004). Biomedical aspects of free radicals: recent developments through the application of EPR. *Electron Paramagnetic Resonance*. **19**: 33-81.
- Burton, G. W. e Ingold, K. U. (1984). B-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. **224**: 569-573.
- Cadet, J., Berger, M. y Dauky, T. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*. **131**: 1-87.

- Cano, A. y Arnao, M. B. (2004). Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina C de zumos de naranja comerciales: relación con sus características organolépticas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. **4**(3): 185-189.
- Cao, G. y Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. **44**(6): 1309-1315.
- Castro, M. A. (2005). Oxidación enzimática de sustratos utilizando diversos mediadores. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Childs, R. E. y Bardsley, W. G. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*. **145**: 93-103.
- Daub, J., Engl, R., Kurzawa, J., Miller, S. E., Schneider, S., Stockmann, A. y Wasielewski, M. R. (2001). Competition between conformational relaxation and intramolecular electron transfer with phenothiazine-pyrene dyads. *Journal of Physical Chemistry A*. **105**(23): 5655-5665.
- De la Monte, S. M. y Wands, J. R. (2006). Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **9**: 167-181.
- Demissie, S., Levy, D., Benjamin, E. J., Cupples, L. A., Gardner, J. P., Herbert, A., Kimura, M., Larson, M. G., Meigs, J. B., Keaney, J. F. y Aviv, A. (2006). Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell*. **5**: 325-330.

- El-Alfy, A. T., Ahmed, A. A. E. y Fatani, A. J. (2005). Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacological Research*. **52**: 264-270.
- Fabbrini, M., Galli, C. y Gentili, P. (2002). Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **16**(5/6): 231-240.
- Ferrer-Viant, D., Jorge-Fonseca, C., Cutiño-Clavel, I., García-Rodríguez, R. E. y Arce-Gómez, D. L. (1999). Radicales libres y su importancia en la homeostasia neuronal. *Medisan*. **3**(3): 5-11.
- Frankel, E. N. y Meyer, A. S. (2000). Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**:1925-1941.
- Gandhi, N. M. y Nair, C. K. (2005) Protection of DNA and membrane from gamma radiation induced damage by gallic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **278**: 111-117.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Lojek, A., Číž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y. S., Caspi, A., Libman, I. y Trakhtenberg, S. (2002) Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **82**:1166-1170.
- Gorinstein, S., Medina Vargas, O., Jaramillo, N. O., Arnao Salas, I., Martínez Ayala, A. L., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Katrich, E. y Trakhtenberg, S. (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*. **225**(3/4): 321-328.

- Gouka, R. J., Van Der Heiden, M., Swarthoff, T. y Verrips, C. T. (2001). Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(6): 2610–2616.
- Gu, Z., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z-Q. y Lipton, S. A. (2005). Nitrosative and oxidative stress links dysfunctional ubiquitination to Parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation*. **12**: 1202-1204.
- Gutteridge, J. M. C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. **41**(12): 1819-1828.
- Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J. y Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. **33**: 601-617.
- Halliwel, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal*. **401**: 1-11.
- Haruenkit, R., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Sajewicz, M., Kowalska, T., Delgado-Licon, E., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S. (2007). Comparative study of health properties and nutritional value of durian, mangosteen and snake fruit: experiments *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 5842-5849.
- Holme, D. J. y Peck, H. (1998). Analytical Biochemistry. Second edition. Longman Scientific & Technical. Inglaterra.



- Hristozov, D., Gadjeva, V., Vlaykova, T. y Dimitrov, G. (2001). Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **109**(4): 331–336.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. L. (2005). Reviews. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1841-1856.
- Ing-Chien, C., Hui-Chi, C., Hui-Wen, Y. y Gan-Li, C. (2004). Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP system in microplates. *Journal of Food and Drug Analysis*. **12**: 29-33.
- Jerlick A., Pitt A. R., Schaur, R. J. y Spickett, C. M. (2000). Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radical Biology and Medicine*. **28**(5): 673-82.
- Johannes, C. y Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. **78**: 193-199.
- Katsube, T., Tabata, H., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Anuurad, E., Shiwaku, K. y Yamane, Y. (2004). Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 2391-2396.
- Kaur, I. P. y Geetha, T. (2006). Screening methods for antioxidants-a review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **6**: 305-312.

- Khantzode, S. S., Muddeshwar, M. G., Khantzode, S. D. y Dakhale, G. N. (2004). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radical Research*. **38**: 81-85.
- Kikuzaki, H. y Nakataki, N. (1993). Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science*. **58**: 1407-1410.
- Kocić, R., Pavlović, D., Kocić, G. y Pešić, M. (2007). Susceptibility to oxidative stress, insulin resistance, and insulin secretory response in the development of diabetes from obesity. *Vojnosanitetski Pregled*. **64**(6): 391-397.
- Kulys, J., Krikstopaitis, K. y Ziemys, A. (2000). Kinetics and thermodynamics of peroxidase and laccase-catalyzed oxidation of N-substituted phenothiazines and phenoxazines. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **5**: 333-340.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **25**(4): 726-732.
- Lee, K. W. y Lee, H. J. (2006). The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors*. **26**: 105–121.
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Číž, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. y Trakhtenberg, S. (2003). Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 5780-5785.

- Leontowicz, M., Leontowicz, H., Drzewiecki, J., Jastrzebski, Z., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. (2007). Two exotic fruits positively affect rat's plasma composition. *Food Chemistry*. **102**: 192-200.
- Li, K., Xu, F. y Eriksson, K. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(6): 2654-2660.
- Lin, F. H., Lin, J. Y., Gupta, R. D., Tournas, J. A., Burch, J. A., Selim, M. A., Monteiro-Riviere, N. A., Grichnik, J. M., Zielinski, J. y Pinnell, S. R. (2005). Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. **125**:826-832.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G. y Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**:2046-2056.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. 3ª Edición. Pearson Education, S. A. Madrid, España.
- Matsingou, T. C., Kapsokefalou, M. y Salifoglou, A. (2000). *In vitro* antioxidant activity of black tea and mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Science*. **65**(6): 1060-1064.
- Maurya, D. K., Salvi, V. P. y Nair C. K. K. (2005). Radiation protection of DNA by ferulic acid under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **280**: 209-217.

- McGuirl, M. y Dooley, D. (1999). Copper containing oxidases. *Current Opinion in Chemical Biology*. **3**: 138-144.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan V. y Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. **84**: 407-412.
- Minuz, P., Fava, C. y Cominacini, L. (2006). Oxidative stress, antioxidants, and vascular damage. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **61**(6): 774-777.
- Moldovan, L. y Moldovan, N. I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*. **122**:395-412.
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L. y Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*. **28**: 57-87.
- Morpungo, L. y Desideri, A. (1980). pH dependence of redox properties of the type 2 Cu-depleted tree laccase. *Febb letters*. **113**(2): 153-156.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(6): 2166-2174.
- Nagorni-Obradović, L., Pešut, D., Škodrić-Trifunović, V. y Adžić, T. (2006). Influence of tobacco smoke on the appearance of oxidative stress in patients with lung cancer and chronic obstructive pulmonary diseases. *Vojnosanitetski Pregled*. **63**(10): 893-895.

- Nälsén, C., Basu, S., Wolk, A. y Vessby, B. (2006). The importance of dietary antioxidants on plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation *in vivo* in middle-aged men. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. **50**(2): 64-70.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M. y Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>•+</sup> assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 4669-4674.
- Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, Å. y Åkesson, B. (2005). Comparison of the 2,2'-azinobis-3 ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition and Food Research*. **49**: 239-246.
- Nishino, H., Tokuda, H., Satomi, Y., Masuda, M., Osaka, Y., Yogosawa, S., Wada, S., Mou, X. Y., Takayasu, J., Murakoshi, M., Jinnno, K. y Yano, M. (2004). Cancer prevention by antioxidants. *Biofactors*. **22**: 57-61.
- Osman, A. M., Wong, K. K. Y., Hill, S. J. y Fernyhough, A. (2006). Isolation and characterization of the degradation products of the mediator ABTS- derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **340**(2): 597-603.

- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z. Jr., Scheerens, J. C. y Miller, A. R. (2006). Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 1151-1157.
- Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Delgado-Licon, E., Martinez Ayala, A. M., Tapia, M. S., Martín-Belloso, O., Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. (2006). Drying of persimmons (*Diospyros kaki L.*) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities. *LWT-Food Science and Technology*. **39**: 748–755.
- Park, Y. S., Jung, S. T., Kang, S. G., Drzewiecki, J., Namiesnik, J., Haruenkit, R., Barasch, D., Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. (2006). *In vitro* studies of polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **57**(1/2): 107-122.
- Pineda-Alonso, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G. y Ferro-Luzzi, A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. **13**(2):104-111.
- Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry*. **227**(40): 37663-37669.

- Polewski, K., Kniat, S. y Slawińska, D. (2002). Gallic acid, a natural antioxidant in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. *Current Topics in Biophysics*. **26**(2): 217-227.
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 4290-4302.
- Reis-Lima, M. J., Tóth, I. V. y Rangel, A. O.S.S. (2005). A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. *Talanta*. **68**(2): 207-213.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. **24**(5): 219-226.
- Roginsky, V. y Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. **92**: 235-254.
- Sagin, F. G. y Sozmen, E. Y. (2004). Anti-inflammatory effects of dietary antioxidants. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. **3**(1): 19-30.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. **8**(3): 121-137.
- Schofield, L. (2007). Antioxidants: a most fruitful category. *Nutraceuticals World*. **10**(3): 52-64.

- Scott, S. L., Chen, W. J., Bakac, A. y Espenson, J. H. (1993). Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *Journal of Physical Chemistry*. **97**: 6710-6714.
- Servais, S., Boussouar, A., Molnar, A., Douki, T., Pequignot, J. M. y Favier, R. (2005). Age-related sensitivity to lung oxidative stress during ozone exposure. *Free Radical Research*. **39**(3): 305–316.
- Shelke, V. (2001). Enzymatic decolourisation of denims: a novel approach. *Zytex News*. **1**(1): 1-2.
- Simon, H. B. Exercise and free radicals. *Harvard Men's Health Watch*, 2007.
- Skoog, D., West, D. y Holler, F. (1995). Química Analítica. 6ª Edición. Mc Graw Hill. Bogotá, Colombia.
- Soares, G. M. B., Pessoa de Amorim, M. T. y Costa-Ferreira, M. (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology*. **89**: 123–129.
- Soares, G. M. B., Pessoa Amorim, M. T., Oliveira-Campos, A. M., Hrdina, R. y Costa-Ferreira, M. (2002). Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. **30**: 607–612.
- Solís-Oba, M. (2005). Estudio del mecanismo de acción del ABTS y la lacasa para la oxidación de compuestos orgánicos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.



- Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I. y Viniegra-González, G. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **579**: 59-66.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z. y Nagy, G. (2007). Topical Review. Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*. **28**: R41-R55.
- Torres-Barajas, L. R. (2006). Deslignificación de pulpa de papel mediante un sistema de reciclaje del mediador ABTS<sup>2-</sup> y un proceso organosolv acoplados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. **31**(2): 126-33.
- Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N. y Proch, J. (2005). Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*. **24**(1): 44-50.
- Wang, H., Cao, G. y Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**: 701-705.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. y Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 4026-4037.
- www.sigma-aldrich.com (25 de Julio de 2007).

Xiao-Hang, Z., Seon Ho, K., In Su, L., Chun Ji, G., Sung Ik, Y. y Kwang-Hyun, A. (2007). Synthesis, photophysical and electrochemical properties of novel conjugated donor-acceptor molecules based on phenothiazine and benzimidazole. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **28**(8): 1389-1395.

Young, I. S. y Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. **54**:176-186.

Yu, L., Perret, J., Dhabi, B., Wilson, J. y Melby, C. L. (2002). Antioxidant properties of cereal products. *Journal of Food Science*. **67**: 2600-2603.

Zhu, X., Perry, G., Moreira, P. I., Aliev, G., Cash, A. D., Hirai, K. y Smith, M. A. (2006). Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **9**: 147-153.