

Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad

Julian Londoño Londoño

Resumen

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y, por lo tanto, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena. Sin embargo, es necesario distinguir también entre actividad estabilizadora de radicales libres o anti-radicalaria (en inglés, scavenger) y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. Por su parte, la segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad anti-radicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante; en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante.

De hecho, hasta ahora, no existen métodos mundialmente unificados para medir capacidad antioxidante, en parte, debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas.

* PhD. Químico Farmacéutico, Docente, Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingenierías, Corporación Universitaria Lasallista.

Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos – GRIAL.

En general, el objetivo de este trabajo es presentar una revisión actualizada de los conceptos fundamentales de los antioxidantes, abarcando desde los radicales libres de importancia biológica, hasta los sistemas de defensa antioxidante y los métodos para medir esta actividad.

Palabras clave: antioxidantes, métodos, estrés oxidativo, radicales libres.

Antioxidants: biological relevance and methods to measure their activity

Abstract

Anti oxidative activity is the capability of a substance to inhibit the oxidative degradation (lipid peroxidation, for instance), in such a way that an antioxidant acts, mainly, thanks to its capability to react with free radicals and, therefore, it is called a chain terminator antioxidant. It is, nonetheless, necessary to differentiate between the stabilization activity of free radicals, or scavenging, and antioxidant activity. The first is completely determined by the reactivity of an antioxidant before free radicals, and can be characterized according to the velocity of such reaction. The second measures the capability to retard the oxidative degradation. Therefore, a high scavenging does not necessarily correlates a high anti oxidative activity. Particularly, some phenolic synthetic compounds are highly reactive before free radicals, but have a moderated anti oxidative activity. As a matter of fact, there are not standardized measurement methods for anti oxidative capability so far, partly due to the disparity of the conditions under which these methods are developed, plus the complexity of the systems and the diversity of matrices to be evaluated. The objective of this work is to present an updated revision of the anti oxidant's main concepts, from the biologically pertinent free radicals to the anti oxidant defense systems and the methods for measuring this activity.

Key words: antioxidants, methods, oxidative stress, free radicals.

Introducción

Los antioxidantes fueron comunes en la industria química y de alimentos durante los siglos XIX y XX. En la industria química se habían estu-

diado los antioxidantes, un grupo de compuestos caracterizados por su capacidad de oxidarse en lugar de otras sustancias presentes en el medio de reacción. Su uso varió, pasando de aditivos en la vulcanización del caucho hasta conservantes de alimentos. Sin embargo, fue solo hasta los años 60 cuando algunos estudios revelaron la importancia de los antioxidantes en la salud, con publicaciones acerca del efecto de los flavonoides, el ácido ascórbico y el estrés oxidativo en el cáncer¹. La expansión en la investigación de los antioxidantes se vería en las décadas subsiguientes, en donde varios investigadores se dedicaron a estudiar el efecto protector de los antioxidantes en diferentes patologías, intentando entender sus mecanismos y blancos moleculares². En cuanto los hallazgos se difundían, el mercado crecía. Para los años 90 el uso de los antioxidantes se había popularizado en los Estados Unidos de América, de tal manera que la mitad de la población consumía suplementos dietarios, un tercio tomaba multivitamínicos y alrededor de una octava parte de la población consumía periódicamente suplementos de vitaminas E y C³.

La suplementación con antioxidantes está fundamentada en estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran la estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento. Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes (principalmente Especies Reactivas del Oxígeno—EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas.

Las ERO, según su propio nombre, presentan una reactividad más alta que el oxígeno molecular. Algunas de ellas pueden ser radicales libres, es decir, moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares. Este electrón desapareado confiere un grado considerable de reactividad al radical libre logrando además que pueda existir de forma independiente por cortos períodos de tiempo⁴.

De estas especies reactivas, las más frecuentes y entre ellas las más relevantes en los sistemas biológicos son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y los radicales formados en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (alcoxilo ($alKO^{\cdot}$) y alquilperoxilo ($alKOO^{\cdot}$)). Entre

las ERO no radicales se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl).

Por otra parte, además de las ERO, existen también especies reactivas del nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico (NO^*) radical del dióxido de nitrógeno (NO_2^*), y formas no radicales, como el anión del peroxinitrito ($ONOO^-$), el ácido peroxinitroso ($ONOOH$), el anión del nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCO_2^-$), el catión nitronium (NO_2^+), y el trióxido del dinitrogeno (N_2O_3), los cuales, junto con las ERO se generan continuamente en cantidades pequeñas en procesos celulares normales como la señalización celular, la neurotransmisión, la relajación del músculo, el peristaltismo, la agregación de las plaquetas, la modulación de la presión arterial, el control del sistema inmune, la fagocitosis, la producción de la energía celular, la regulación del crecimiento celular, la síntesis de componentes biológicos importantes y el metabolismo de xenobióticos^{5,6}.

A escala biológica, una de las principales fuentes de radicales libres son las enzimas; algunas de ellas producen radicales como intermediarios catalíticos; esto ocurre generalmente para las enzimas que metabolizan xenobióticos, los cuales son oxidados o reducidos por intercambio de un solo electrón para formar radicales intermediarios⁷. Las más importantes enzimas del metabolismo de xenobióticos son:

- Citocromo P450: es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas que actúan principalmente como función monoxigenasa.
- Peroxidasas, en particular prostaglandina H sintasa, y en poco grado la metamioglobina.
- Flavoproteínas: en particular las que se involucran en la cadena transportadora de electrones con función oxidasa.

Entre los radicales endógenos que actúan como intermediarios del metabolismo celular se encuentran: los derivados de coenzimas, por ejemplo la oxidación de un solo electrón del NAD(P)H puede producir $NADP^*$; radicales derivados del glutatión (GSH), radical til (GS^*). Este proceso ocurre cuando el GSH, la molécula tiolada más concentrada y soluble en la célula, reacciona con el radical anión superóxido (O_2^*) o el radical hidroxilo (HO^*); este es un mecanismo de protección natural contra radicales más reactivos; y finalmente los radicales derivados de ácidos grasos poliinsaturados, donde estos últimos son blancos muy sensibles para la iniciación de una reacción en cadena mediada por radicales⁸.

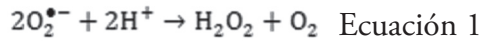
Otra fuente relevante de producción de radicales libres en el plano biológico es la respiración celular. El oxígeno molecular (también llamado oxígeno triplete ($^3\Sigma_g O_2$)), que mantiene la vida de todos los organismos aerobios, resulta ser tóxico, pero su reactividad en sistemas biológicos es de una tasa bastante lenta. Sin embargo, puede llegar a ser altamente tóxico gracias a uno de los conceptos más atractivos en la toxicología moderna como es la activación metabólica, que afirma “que algunas sustancias altamente tóxicas no lo son por sí mismas, pero su toxicidad puede llegar a ser bastante alta debido a que son metabólicamente transformadas en uno o más intermediarios altamente reactivos que pueden reaccionar con componentes celulares”. Tal es el caso del estado molecular del oxígeno, el cual no es tóxico ya que su propia reactividad es baja en condiciones fisiológicas, pero resulta bastante tóxico si es activado metabólicamente a la forma singulete. Esta activación metabólica resulta del hecho de que, en sistemas biológicos, la reducción de O_2 a H_2O en la cadena transportadora de electrones se da por la transferencia de un electrón para formar radicales o especies moleculares reactivas⁹.

Especies reactivas de importancia biológica

Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})

El anión superóxido es formado por la reducción univalente del oxígeno molecular en estado triplete 3O_2 que llena uno de los orbitales π^*2p con la adición de un electrón que tiene un spin inverso. Es considerado la ERO “primaria” y puede interactuar de nuevo con otras moléculas para generar una ERO “secundaria”, frecuentemente por procesos enzimáticos o catalizado por metales. El $O_2^{\cdot-}$ puede ser protonado para dar dióxido de hidrógeno, peridroxilo, hidrodioxilo o radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}). La generación de $O_2^{\cdot-}$ se da a partir de radiólisis del oxígeno molecular, fotólisis del agua y por más radicales orgánicos formados en células aeróbicas como lo son (NAD^{\cdot}), (FpH^{\cdot}), radicales semiquinona, radical piridinio catión o por hemoproteínas. Igualmente, es producido por leucocitos fagocíticos como producto inicial de la explosión respiratoria al consumir O_2 . El radical $O_2^{\cdot-}$ no reacciona directamente con los polipéptidos, los azúcares, o los ácidos nucleicos, y su capacidad de peroxidizar los lípidos es polémica^{10,11}.

El superóxido se agota al experimentar una reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), de acuerdo con **Ecuación 1**.



Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Algunos sistemas biológicos que generan $\text{O}_2^{\bullet-}$ producirán H_2O_2 por dismutación. El H_2O_2 es la segunda especie molecular en los pasos de la reducción univalente del oxígeno molecular. Esto corresponde a la ocupación del segundo orbital π^*2p antienlazante. El H_2O_2 no es un radical, ya que todos sus orbitales contienen dos electrones con spins antiparalelos. Este también es el más estable y el menos reactivo de los productos de la reducción del oxígeno molecular. Es un producto generado por diferentes oxidasas, principalmente oxidasas peroxisomales, y algunas enzimas mitocondriales. En condiciones biológicas, el H_2O_2 es un oxidante débil que puede oxidar grupos tiol de proteínas o grupos acilo poliinsaturados en lípidos. Sin embargo, la reacción del H_2O_2 con hierro (Fe^{2+}) u $\text{O}_2^{\bullet-}$ genera un radical más reactivo, el radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Además, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con cloruro (Cl^-) en presencia de mieloperoxidasas para generar ácido hipocloroso (HClO) y puede formar puentes de hidrógeno estables y complejos con los pares de bases de ácidos nucleicos lo que genera alta reactividad sobre el ADN¹².

Radical hidroxilo (HO^{\bullet})

Los principales procesos que producen radical hidroxilo son:

- Radiólisis (rayos X, rayos gamma), sonólisis, fotólisis del agua empleando una longitud de onda alrededor de 350 nm y fotólisis del H_2O_2 con luz UV.
- Reducción univalente del peróxido de hidrógeno H_2O_2 por:
 - $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la reacción de Haber Weiss.
 - Fe^{2+} (o otros iones metálicos tales como Cu^{2+}) en la reacción de Fenton.
 - NO^{\bullet}
- Por descomposición fotolítica de alquilhidroperóxidos.

El radical hidroxilo (HO^{\bullet}) es una de las especies químicas más reactivas producida en organismos vivos; es tan altamente reactiva que el sitio de formación es el mismo sitio de reacción. El HO^{\bullet} solo se difunde cerca de 5 a 10 diámetros moleculares antes de reaccionar. Esta reacción tiene una

tasa de velocidad extremadamente alta con proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, y ácidos orgánicos; y relativamente alta con estructuras aromáticas y alifáticas (10^7 a $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)¹³.

El radical inicia reacciones en cadena por abstracción de un átomo de H, pero también es un poderoso oxidante que fácilmente captura electrones para formar HO•. Aún más, el HO• puede añadirse a anillos aromáticos y olefinas o se puede dimerizar para formar H₂O₂. Los mayores blancos donde pueden provocar daños los efectos del radical hidroxilo en sistemas biológicos son los ácidos nucleicos, las proteínas y los ácidos grasos poliinsaturados¹⁴.

Radical peroxilo ROO•

Un radical típico derivado del oxígeno formado en sistemas vivos son los radicales peroxilo (ROO•). Este tipo de radicales son especies altamente energéticas con un potencial de reducción en un rango de +0.77 a +1.44V, dependiendo del grupo sustituyente (R). El radical más simple del peroxilo es el radical dioxil (hidroperoxil HOO•).

Las características interesantes de los radicales peroxilo están en la diversidad de reacciones biológicas en las cuales participan. La detección y la medida de la peroxidación lipídica son citadas con más frecuencia como evidencia para apoyar la implicación de las reacciones del radical peroxilo en procesos deletéreos. Los radicales peroxilo están implicados, al igual que el HO•, en el rompimiento del ADN y modificación de las proteínas¹⁵.

Radical NO•

El óxido nítrico (NO•) es un radical abundante que actúa como una molécula oxidativa biológicamente importante, actúa como señalizador en una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la regulación de la presión arterial, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune. Esta pequeña molécula contiene un electrón desapareado en el orbital $2\pi^*$ antienlazante y es, por lo tanto, un radical. El NO• es generado en los tejidos biológicos por la enzima óxido nítrico sintetasa, que metaboliza la conversión de arginina a citrulina con la concomitante formación de NO•¹⁶.

Las células del sistema inmune producen el anión superóxido y el óxido nítrico durante los procesos inflamatorios. Bajo estas condiciones, el óxido

nítrico y el anión superóxido pueden reaccionar para producir cantidades significativas de una molécula mucho más activa, el anión peroxinitrito (ONOO^-), el cual puede causar fragmentación del ADN y oxidación lipídica¹⁷.

El NO^\bullet puede ser convertido a otra variedad de especies reactivas del nitrógeno tales como catión nitroso (NO^+) o anión nitroxilo (NO^-)¹⁸

La exposición a radicales libres de una variedad de fuentes ha hecho que los organismos desarrollen una serie de mecanismos de defensa que incluyen: 1) remoción catalítica de radicales libres por enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx). 2) unión de proteínas a metales prooxidantes como hierro y cobre (transferrina, ceruloplasmina). 3) protección contra daño, como las proteínas de choque térmico y 4) estabilización de radicales libres con donadores de protones o electrones como glutatión (GSH), vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubina y ácido úrico.

Sistemas de defensa enzimático

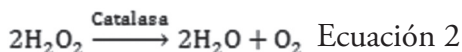
Superóxido dismutasa (SOD)

Es la enzima que cataliza la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a especies menos reactivas (O_2 y H_2O_2). En células de mamíferos existen dos tipos de SOD descritas: la enzima Cu-Zn localizada en el citosol y la enzima Mn principalmente en mitocondria. Aunque esta última enzima está bajo control de procesos reguladores inducidos, por ejemplo, por interleuquina 6 y los glucocorticoides, ambas enzimas catalizan la reacción de dismutación con la misma eficiencia¹⁹.

Catalasa

El peróxido de hidrógeno es producido por una reducción divalente del oxígeno molecular o por dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) parece ser un buen candidato para explicar algunas de los efectos producidos por las especies reactivas del oxígeno. De hecho, el H_2O_2 es una molécula estable, no es un radical, y se puede difundir a través de membranas biológicas. La catalasa (CAT) es una enzima presente en las plantas, animales y bacterias aeróbicas; está localizada en los peroxisomas y es muy eficiente en la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y a oxígeno molecular. Cada molécula de esta enzima es capaz de convertir 6

millones de moléculas de H_2O_2 a agua y oxígeno por cada minuto. La reacción catalítica utiliza dos moléculas de H_2O_2 sin utilización de otro tipo de sustrato, tal como se muestra en la **Ecuación 2**^{20, 21}.



La CAT ha sido utilizada como agente terapéutico para tratar procesos en los que el H_2O_2 ha sido involucrado como el mayor agente deletéreo, tal como lesión inflamatoria, y xeroderma pigmentoso.

Antioxidantes no enzimáticos

Vitamina E

Este es el nombre genérico de una familia homogénea de compuestos que tienen en su estructura una porción hidroquinona metilada en mayor o menor grado y una cadena isoprenoide. El α -tocoferol, el componente más abundante de la vitamina E, es bien conocido y representa la mayor posibilidad de prevención de la peroxidación de membrana por estabilización de radicales peroxilo. La vitamina E tiene un grupo hidroxilo fenólico responsable de su actividad estabilizadora de radicales libres y una cadena ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}$) que favorece su inserción en la región lipídica de la bicapa. En sistemas biológicos, una molécula de vitamina E permite proteger 10.000 moléculas de ácidos grasos insaturados²².

Como se muestra en la figura 1A, la vitamina E puede reaccionar con radicales lipídicos peroxilo, para formar vitamina E radical que es poco reactiva como para reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados, actuando en la reacción de peroxidación lipídica como terminador de cadena. La vitamina E radical producida es estable porque el electrón desapareado del átomo de oxígeno puede ser deslocalizado dentro de la estructura del anillo aromático²³.

Vitamina C (Ácido ascórbico)

La vitamina C es un antioxidante que actúa en medios acuosos, como el líquido pleural, el fluido ocular y el espacio intersticial. Actúa en combinación con otros antioxidantes primarios como la vitamina E y los carotenoides, así como en conjunto con las enzimas antioxidantes. La vitamina C coopera con la Vitamina E regenerando el α -tocoferol desde el radical α -tocoferilo en membranas y lipoproteínas. La mayoría de plantas y animales sintetizan ácido ascórbico a partir de la glucosa; sin embargo, los

humanos son incapaces de sintetizarlo y requieren obtenerlo de la dieta. El ácido ascórbico es requerido como un cofactor para la actividad enzimática, y su deficiencia dietética causa una enfermedad conocida como escorbuto.

Como se aprecia en la figura 1B, la donación de un electrón por el ácido ascórbico produce el radical semidihidroascorbil, que puede ser nuevamente oxidado para dar dihidroascorbato. El ácido ascórbico es el único antioxidante endógeno en plasma que puede proteger contra el daño peroxidativo inducido por radicales peroxilo²⁴.

Carotenoides

El β -caroteno ha sido referido como una provitamina A, debido a su capacidad de ser metabolizado en animales a la vitamina A. El β -caroteno se divide para formar dos moléculas de retinaldehído, una fracción de menor importancia se oxida irreversiblemente a ácido retinoico; la cantidad restante es reducida a retinol. El papel biológico de los carotenoides no está limitado solamente a la producción de retinoides o a la protección del aparato fotosintético de plantas contra el daño de la luz; también se ha demostrado que: previene el daño por fotosensibilidad en bacterias, animales y humanos; disminuye el daño genético y las transformaciones malignas; inhibe la inducción tumoral provocada por los rayos UV y agentes químicos y disminuye las lesiones premalignas en humanos. Su principal mecanismo de estabilización de radicales libres (figura 1C) está determinado por su capacidad para estabilizar el oxígeno singlete y convertirlo nuevamente a su forma menos reactiva (triplete) a expensas de una activación intramolecular²⁵.

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos con amplia distribución en plantas. Estructuralmente consisten de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos por un heterociclo piránico (anillo C). Biosintéticamente son de origen mixto, pues el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A, mientras que los anillos B y C provienen de la ruta del ácido shikímico. Para su estudio sistemático, los más de 4000 flavonoides descritos hasta ahora se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta el anillo C. De acuerdo con esto, los flavonoides se clasifican en varios grupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas e isoflavonoides²⁶.

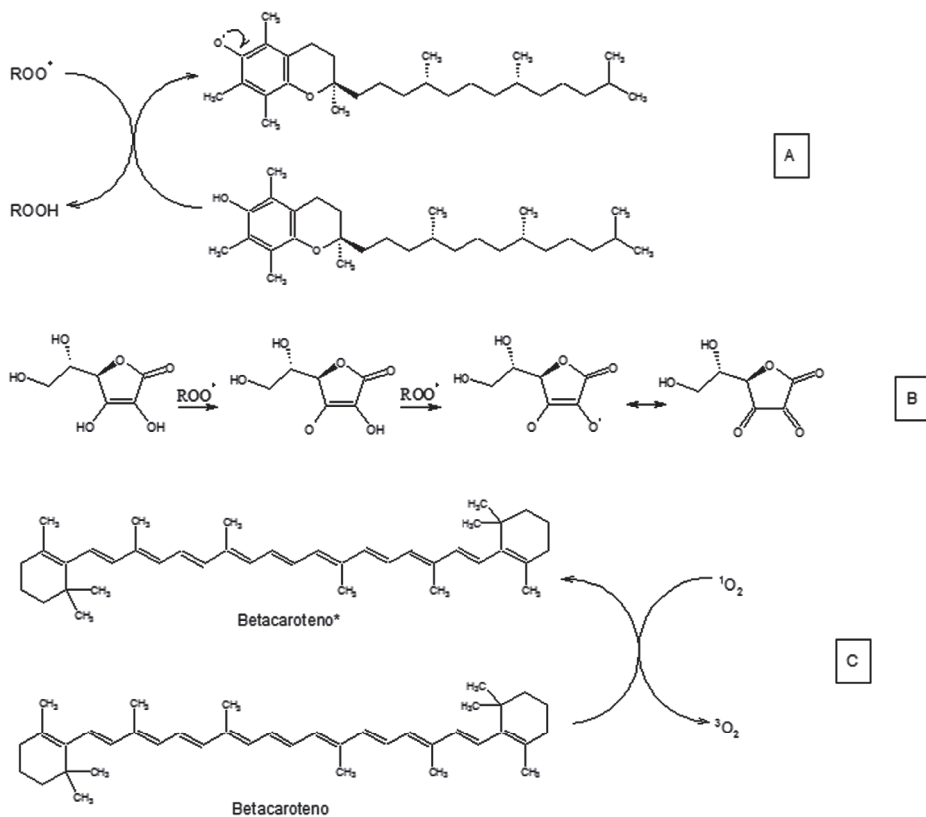


Figura 1. Mecanismo propuesto para la estabilización de radicales libres por la vitamina E (α -tocoferol) (A); vitamina C (ácido ascórbico) (B); y betacaroteno (C).

Las cantidades de flavonoides y polifenoles en alimentos y plantas incluidas en la dieta humana (frutas, vegetales, té, vino, café, cacao) son mucho más altas que las cantidades de otros antioxidantes como las vitaminas C y E, lo cual hace de estos compuestos los principales antioxidantes adquiridos en la dieta²⁷.

Los flavonoides han mostrado una fuerte actividad antioxidante en sistemas *in vitro*, principalmente gracias a su bajo potencial de oxidación lo que les confiere capacidad de estabilizar radicales libres donando electrones o átomos de hidrógeno²⁸. Sin embargo, a pesar de su fuerte actividad *in vitro*, se ha visto que su efecto *in vivo* es limitado por varios factores, entre ellos la baja absorción, la baja biodisponibilidad y la alta tasa de depuración²⁹.

En general, la controversia es grande, pero se acepta que una dieta rica en frutas y vegetales con alto contenido de polifenoles está asociada con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, infarto, cáncer y otras enfermedades crónicas. De hecho, 7 de 12 estudios epidemiológicos que evaluaron el riesgo de enfermedades cardiovasculares reportan un efecto protector de los flavonoides^{30,31} atribuido principalmente a su actividad antioxidante, puesto que el hecho común de estas patologías es un desbalance oxidativo^{32, 33}.

En la figura 2 se presenta un resumen general de los mecanismos de oxidación. En el recuadro superior se esquematiza el proceso condensado de respiración celular, en donde el oxígeno molecular es convertido inicialmente a anión superóxido, luego a peróxido de hidrógeno, después a radical hidroxil y finalmente oxidado hasta agua.

En el esquema central se muestra que el metabolismo celular puede generar radicales libres tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo. El anión superóxido puede sufrir dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa para generar peróxido de hidrógeno, menos reactivo, pero igualmente tóxico para los tejidos, por lo cual es convertido a agua por acción de las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa, esta última lleva a cabo la reducción del peróxido de hidrógeno a expensas de la oxidación del glutatión, el cual es regenerado por acción de la enzima glutatión reductasa que utiliza como cofactor el NADPH.

El peróxido de hidrógeno puede también ser convertido a radical hidroxilo mediante una reacción tipo Fenton catalizada por hierro. Una vez producido, el radical hidroxilo ataca proteínas, ácidos nucleicos y esencialmente ácidos grasos poliinsaturados, generando así radicales lipídicos que reaccionan rápidamente con oxígeno para producir radicales peroxilo, los cuales tienden a estabilizarse produciendo hidroperóxidos, que a su vez pueden ser descompuestos para generar fragmentos más pequeños (dienos conjugados) o bien, por la acción de metales de transición, generar de nuevo radicales peroxilo.

La estabilización de los radicales libres derivados de lípidos puede ser llevada a cabo por antioxidantes fenólicos como flavonoides y tocoferoles, los cuales estabilizan el radical libre generando en sí mismos radicales libres (fenoxilo y tocoferilo, respectivamente), que pueden ser estabilizados intramolecularmente por deslocalización o bien reaccionar con ácido ascórbico para regenerar el compuesto reducido.

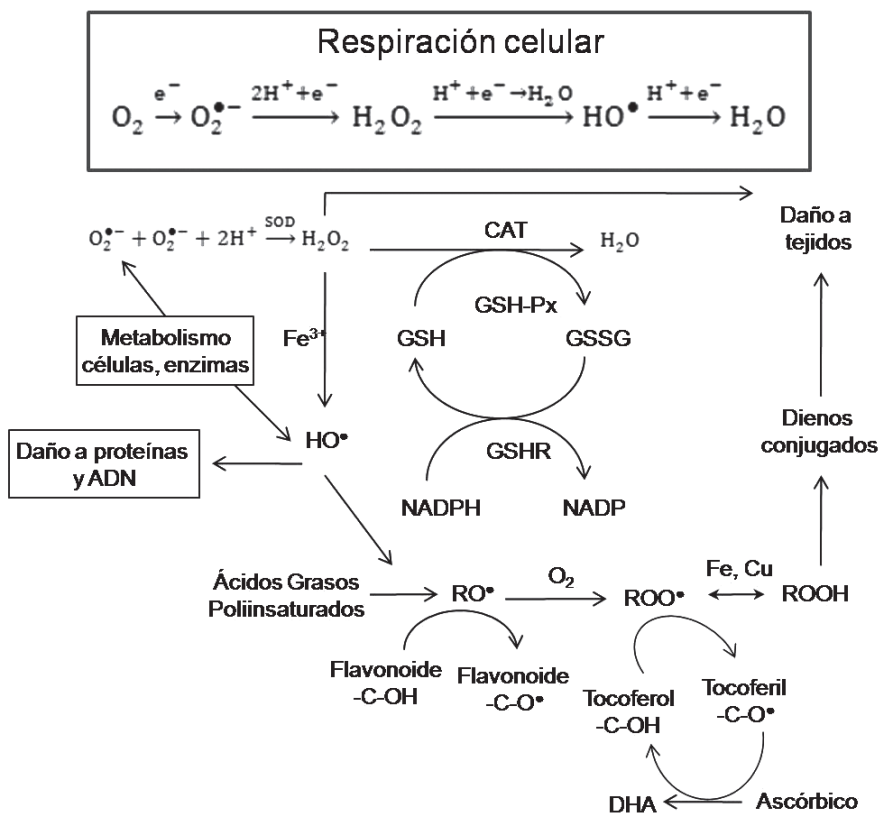


Figura 2. Resumen de las vías de producción de radicales libres y los principales sistemas antioxidantes, enzimáticos y no enzimáticos.

$O_2^{\bullet -}$: radical anión superóxido, HO^{\bullet} : radical hidroxilo, RO^{\bullet} : radical alquilo, ROO^{\bullet} : radical peróxido, $ROOH$: hidropéroxido, Fe: hierro, Cu: cobre, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GSH-Px: glutatión peroxidasa, GSHR: glutatión reductasa, NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, CAT: catalasa, SOD: Superóxido Dismutasa.

Métodos para medir actividad antioxidante

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica).

En las fuentes dietarias, la presencia de antioxidantes depende, entre otros factores, de la parte del alimento en cuestión. Por ejemplo, los monofenoles (tocoferoles principalmente) tienden a ser más abundantes en semillas donde hay grandes cantidades de grasas; por su parte los monoterpenos aromáticos son los principales componentes de las fracciones volátiles,

mientras que los polifenoles, con mayor polaridad, están presentes en frutas y constituyen una de las principales fuentes de antioxidantes dietarios.

A pesar de que los polifenoles están asociados con varios mecanismos, se cree que su principal modo de acción está relacionado con la alta reactividad hacia radicales libres. Sin embargo, debe distinguirse entre capacidad antioxidante y reactividad. Mientras que la capacidad antioxidante da información acerca de la duración del efecto antioxidante, la reactividad caracteriza solo la dinámica de inicio del efecto antioxidante a una concentración fija de compuesto³⁴.

En el contexto de la inhibición de procesos de reacción en cadena mediados por radicales libres (por ejemplo peroxidación lipídica), un antioxidante actúa gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres y por lo tanto recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena. Sin embargo, es necesario distinguir también entre actividad estabilizadora de radicales libres o anti-radicalaria (en inglés, scavenger) y actividad antioxidante. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a radicales libres, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. De otro lado, la actividad antioxidante mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad anti-radicalaria no siempre correlaciona con una alta actividad antioxidante, en particular, algunos compuestos fenólicos sintéticos presentan alta reactividad frente a radicales libres, pero muestran moderada actividad antioxidante, debido a la alta reactividad de los derivados fenoxil o semiquinona formados después de la estabilización de los radicales libres³⁵. En conclusión, la actividad antioxidante está determinada por: 1) reactividad química del antioxidante, 2) capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y 3) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres.

La necesidad de establecer métodos unificados para medir capacidad antioxidante quedó manifestada por el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes llevado a cabo en Orlando, Florida, EUA en junio del año 2004. El propósito de esta reunión fue discutir acerca de la forma en la cual se determina la capacidad antioxidante de alimentos, fitoterapéuticos, nutraceuticos y suplementos dietarios y proponer métodos analíticos que pudieran ser estandarizados como procedimientos de rutina, debido a que los métodos existentes presentan resultados inconsistentes,

no existe equivalencias entre unos y otros y la interpretación de las conclusiones, en algunos casos, va más allá del alcance de los resultados.

El argumento de esta propuesta se fundamenta en el auge cada vez más creciente en el tema de los antioxidantes. De hecho, se estima que el incremento en el número de publicaciones en esta área en los últimos 10 años fue de más del 340%, mientras que las publicaciones en las demás áreas incrementaron tan solo 39%. Esto está unido al incremento de productos con proclamas de efectos antioxidantes, lo cual impone la necesidad de tener métodos estandarizados que permitan: 1) dar una guía para una aplicación correcta del ensayo, 2) comparar entre alimentos o productos comerciales, 3) servir como una herramienta para el control de calidad, 4) proveer estándares para la regulación y las declaraciones de efectos en la salud³⁶.

Pese a esto, hasta ahora, no existen métodos mundialmente unificados para medir capacidad antioxidante, en parte, debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas. Un método unificado para determinar capacidad antioxidante debería estar estandarizado y cumplir con los siguientes requisitos: 1) utilizar un radical biológicamente relevante, 2) ser un método simple, 3) utilizar un punto final definido y un mecanismo conocido, 4) emplear instrumentación fácilmente disponible, 5) tener buena reproducibilidad, 6) ser adaptable para medir antioxidantes lipofílicos/hidrofílicos y a diferentes radicales, 7) ser adaptable a formatos de tamizaje de alta capacidad para control de calidad de rutina en gran cantidad de muestras³⁷.

Queda de manifiesto que ningún método reflejará por sí solo la “capacidad antioxidante total” de una muestra, puesto que este parámetro deberá expresar la capacidad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos antioxidantes y evaluar la reactividad del antioxidante frente a diferentes especies reactivas.

En la tabla 1 se resumen las características de los métodos más utilizados actualmente para medir capacidad antioxidante y más adelante se describen en detalle las particularidades de cada uno, haciendo énfasis en su principio de funcionamiento, ventajas y desventajas.

En general, existen varias aproximaciones para la clasificación de métodos para medir actividad antioxidante. Una de ellas se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos³⁸, mientras que otra los clasifica de acuerdo con el mecanismo mediante el cual sucede el proceso antioxidante.

En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, de hecho, se ha popularizado el uso de algunos radicales libres metaestables, coloreados, con fuerte absorción en el espectro visible, como herramienta para determinar actividad estabilizadora de radicales libres (Ej. DPPH, ABTS). Sin embargo, varios estudios han controvertido esta aproximación considerando que con estos métodos se puede medir solo la capacidad para donar hidrógenos, pero que, en muchos casos, no se correlacionan con la capacidad antioxidante. Por su parte, los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros; los lípidos constituyen el sistema más frecuente debido a la importancia de su oxidación en el desarrollo de enfermedades, así como en el deterioro de la calidad de los alimentos.

Tabla 1 Comparación de métodos para medir capacidad antioxidante basada en la instrumentación requerida, la relevancia biológica, el mecanismo antioxidante, el punto final, el método de cuantificación y la adaptabilidad para medir antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos³⁹.

Método	Instrumentación ^a	Relevancia biológica ^b	Mecanismo ^c	Punto final	Cuantificación ^d	Lipofílicos -hidrofílicos ^e
CARO	–	+++	TAH	Tiempo	ABC	+++
PATAR	++	+++	TAH	Fase de inducción	CE ₅₀ , Fase de inducción	--
CRHF	---	--	TE	Tiempo	Absorbancia	---
ABTS	–	–	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia	+++
DPPH	–	–	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia CE ₅₀	–
Peroxidación lipídica – LDL	--	+++	TAH	Fase de inducción	Tiempo de inducción, dienos conjugados, SRAT	---

^a De la más (+++) a la menos (---) especializada

^b Del más (+++) al menos (---) relevante

^c TAH: Transferencia de Átomos de Hidrógeno, TE: Transferencia de Electrones

^d ABC: Área Bajo la Curva, CE₅₀: Concentración efectiva 50, SRAT: Sustancias Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico.

^e Del más (+++) al menos (---) adaptable

Métodos directos: inhibición de la peroxidación lipídica

Debido a la susceptibilidad conferida por su estructura química (enlaces dobles cis separados por un metileno alílico), los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son blancos sensibles de los radicales libres, los cuales extraen fácilmente átomos de hidrogeno de los metilenos alílicos, de hecho, la oxidabilidad de los ácidos grasos insaturados depende linealmente del número de metilenos bis alílicos que estos contengan⁴⁰. De manera general, la sucesión de eventos en la peroxidación lipídica pueden ser descritos como se muestra en la figura 3.

Ácido linoléico (C18:2) - AGPI

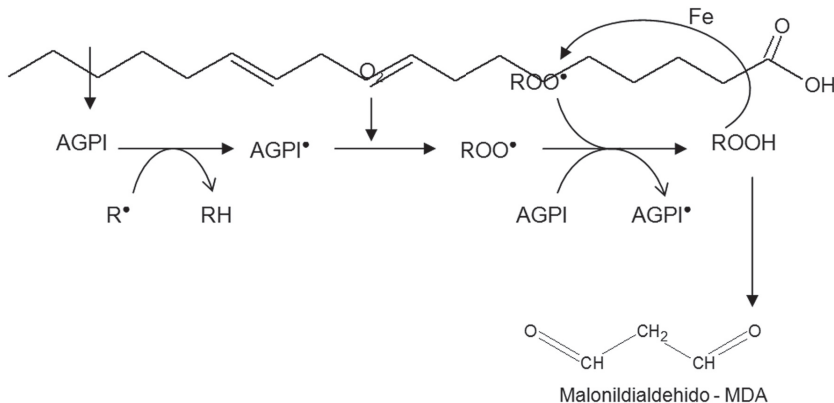
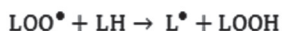
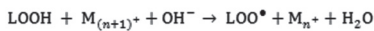
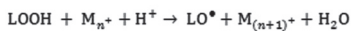
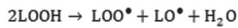


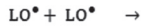
Figura 3. Representación esquemática de la peroxidación lipídica.
 R• Radical libre, ROO• Radical alquil peroxil, ROOH hidroperóxido,
 AGPI Acido Graso Poliinsaturado.

Las etapas que cursan en el proceso de peroxidación lipídica son caracterizadas por un primer paso llamado iniciación, representado en la ecuación 3, en donde el radical libre ataca al sustrato oxidable, seguido de una etapa rápida de propagación y rompimiento descrita en las ecuaciones 4 y 5, en la cual se da la reacción en cadena o lipoperoxidación propiamente dicha y finalmente una etapa de terminación como se muestra en la ecuación 6. Estas etapas son descritas con mayor detalle a continuación:





Ecuación 5 (rompimiento)



Ecuación 6 (terminación)



LH representa el sustrato oxidable, por ejemplo un lípido y X^\bullet el radical libre. La oxidación genera el radical alquilo (L^\bullet) que reacciona rápidamente con oxígeno para producir un radical más reactivo llamado peroxilo (LOO^\bullet).

Los radicales peroxilo son los propagadores de la reacción en cadena, pueden oxidar otros lípidos o moléculas susceptibles produciendo hidroperóxidos (LOOH), los cuales, en presencia de metales de transición (M) como hierro o cobre (incluyendo hierro de proteínas o hemoproteínas) se degradan para producir un amplio rango de compuestos entre alcoholes, aldehídos, alquil formiatos, cetonas y radicales libres incluyendo radical alcóxilo LO^\bullet . Los aldehídos más importantes producidos en la peroxidación lipídica son los 4 hidroxialquenes (principalmente 4-hidroxinonal y 4-hidroxihexanal) y el malondialdehído MDA^{41} .

En este contexto, el papel exacto de los iones de metales de transición en la iniciación de la reacción en cadena de peroxidación lipídica es difícil de definir, pero se ha establecido que su mayor papel es catalizar la descomposición de los hidroperóxidos en reacciones de rompimiento más que participar en la abstracción de átomos de hidrógeno. De hecho, se ha establecido que en medio ácido estos metales de transición pueden descomponer los hidroperóxidos a radicales alcóxilo, mientras que en medio básico generan radicales peroxilo.

Finalmente en la reacción de terminación está involucrada la combinación de radicales para formar productos no radicalarios.

La forma de detección de un efecto antioxidante utilizando este sistema consiste en la determinación de la cinética de producción de dienos conjugados, los cuales pueden ser detectados a 234 nm y seguir así la evolución del proceso oxidativo desde sus etapas más tempranas. Sin embargo, entre las desventajas de esta forma de medición se encuentra que aun con lípidos simples, la medición espectrofotométrica de dienos conjugados es solo una

forma genérica de detección sin dar información de la estructura de los productos formados; adicionalmente, esta medición se dificulta cuando los sustratos son más complejos (tejidos, plasma, lipoproteínas) debido a las interferencias que podrían estar presentes⁴².

En general, la expresión de los resultados se basa en la determinación de la fase de inducción, es decir, el momento en el cual la velocidad de la oxidación incrementa; comúnmente la fase de inducción se determina como la intersección entre la tangente de la curva cinética en la fase de propagación y el eje del tiempo; sin embargo, esta forma gráfica de determinación genera un valor incierto el cual depende de la forma en como se monitorea la reacción y la sensibilidad del equipo usado⁴³.

Otra alternativa utilizada como medición de punto final de la oxidación lipídica es el ensayo SRAT (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico), también conocido por su sigla en inglés como TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Este método fue desarrollado hace más de 40 años y es ampliamente usado en la actualidad como un método para detectar peroxidación lipídica. Este procedimiento mide el malondialdehído (MDA) formado como producto principal de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos. Como se puede apreciar en la Figura 4, cada mol de MDA reacciona con dos moles de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) para formar un producto de color rosa que puede ser medido espectrofotométricamente a 532–535 nm⁴⁴. Se han utilizado diferentes sustratos en el ensayo SRAT, entre ellos: muestras de tejidos, ácido linoleico, microsomas, liposomas y lipoproteínas. Una de las principales críticas a este método radica en la posibilidad de falsos positivos debido a la complejidad de la matriz y por lo tanto, se ha propuesto la cuantificación cromatográfica de MDA como el mejor esquema para determinar peroxidación lipídica.

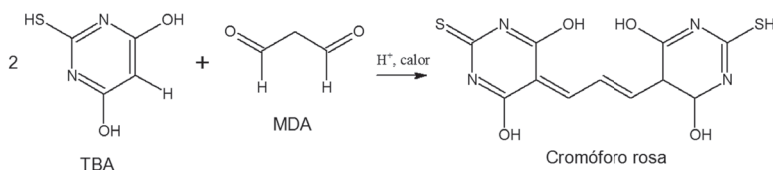


Figura 4. Fundamento del método SRAT mostrando la reacción del MDA (Malondialdehído) con Ácido Tiobarbitúrico (TBA) para producir un derivado de color rosa.

Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

En el organismo, los lípidos (fosfolípidos, triglicéridos y colesterol), al no ser solubles en un medio acuoso como el plasma, se unen a proteínas específicas (apoproteínas, entre ellas AI, AII, B48, B100, CI, CII y CIII) formando las lipoproteínas. Las lipoproteínas son macromoléculas metabólicamente diferentes entre sí, con una determinada composición química, características de flotación por ultracentrifugación, movilidad electroforética y densidad. Este último parámetro ha servido para clasificarlas en orden decreciente como: lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones (QM)⁴⁵.

Específicamente, las LDL constituyen el 50% del total de lipoproteínas del plasma, tienen una vida media en sangre del orden de días y son la vía primordial de entrega de lípidos a las células. Su densidad es baja (1.019–1.063 g/mL), su tamaño es pequeño (18–28 nm) y está compuesta principalmente de colesterol (50%), fosfolípidos (22%) y ApoB100, lo que la hace un blanco susceptible de oxidación.

La oxidación de la LDL se ha propuesto como un proceso biológico que inicia y acelera el desarrollo de las lesiones arteriales debido a la acumulación de lipoproteínas oxidadas (oxLDL) en la íntima arterial⁴⁶. De hecho, se cree que es poco probable que la oxidación de LDL ocurra en plasma debido a la presencia de altas concentraciones de antioxidantes y la baja disponibilidad de iones metálicos, los cuales se encuentran unidos a proteínas y, por lo tanto, es más probable que este proceso ocurra en un ambiente como la íntima arterial donde los antioxidantes pueden agotarse y las lipoproteínas se exponen a un estrés oxidativo.

En este sentido, se han propuesto varios mediadores celulares y bioquímicos de la oxidación de la LDL *in vivo*; existe gran controversia al respecto, pero se coincide en el papel que juegan algunas enzimas como la lipoxigenasa y las especies reactivas de nitrógeno, específicamente el óxido nítrico, un radical libre relativamente estable que normalmente no oxida la LDL a pH fisiológico, pero que puede contribuir a la oxidación de la lipoproteína interactuando con el anión superóxido para producir el peroxinitrito, un oxidante fuerte con reactividad similar al radical hidroxilo. El peroxinitrito promueve la peroxidación lipídica de la LDL *in vitro* y se ha demostrado que *in vivo* puede nitrar los residuos de tirosina de la

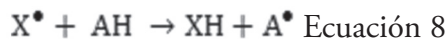
ApoB100, detectando altos niveles de nitrotirosina en lesiones ateroscleróticas humanas^{47,48}.

En cuanto a la oxidación de LDL *in vitro*, se han descrito varios métodos para producir oxLDL, entre ellos, la oxidación mediada por células endoteliales⁴⁹ y sistemas libres de células con oxidación inducida por iones metálicos⁵⁰, peroxinitrito⁵¹, mieloperoxidasa⁵², lipoxigenasa⁵³. Sin embargo, debido a su simplicidad, la exposición de LDL a Cu²⁺ durante 18–24 horas se ha convertido en un método ampliamente difundido para la oxidación de LDL *in vitro*, aunque su relevancia *in vivo* sea aun debatida debido a las concentraciones no fisiológicas de Cu²⁺ empleadas.

Existe otra clasificación que describe los métodos para medir actividad antioxidante según sea su mecanismo de reacción, pues se conoce que los antioxidantes pueden estabilizar radicales libres siguiendo dos mecanismos, uno llamado Transferencia de Átomos de Hidrogeno (TAH) y otro denominado Transferencia de Electrones (TE), los cuales pueden ocurrir de forma paralela; ambos dan como resultado la estabilización del radical libre; sin embargo, el mecanismo que domina un sistema será determinado por la estructura química del antioxidante, su solubilidad, coeficiente de partición, Energía de Disociación de Enlace (EDE), Potencial de Ionización (PI) y condiciones del medio de reacción, como el pH⁵⁴.

Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)

Los métodos TAH miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. Como se muestra en la ecuación 7, un sustrato oxidable (LH) es atacado por un radical libre (X[•]) generando una especie no radicalaria (XH) y un nuevo radical libre (L[•]). Por su parte, en la ecuación 8 se muestra cómo el antioxidante (AH) transfiere un átomo de hidrógeno para estabilizar el radical libre X[•] y generar la especie A[•].



De esta forma, la reactividad de un antioxidante siguiendo un mecanismo TAH estará determinada por la EDE del grupo que contiene el hidrógeno a transferir. En el caso de los compuestos fenólicos se trata de un enlace ArO-H en donde una muy baja EDE implica que la reacción descrita por la ecuación 8 es termodinámicamente más favorable que aque-

lla descrita por la ecuación 7. En otras palabras, significa que un radical libre reaccionará más rápidamente con el antioxidante que con el sustrato oxidable. Adicionalmente, la especie A^{\bullet} , generada en el proceso de estabilización del radical libre, debe ser tan estable como para no reaccionar con el sustrato e iniciar nuevamente una reacción de oxidación, pero lo suficientemente reactiva como para estabilizar radicales libres en un proceso de terminación de cadena.

Se acepta que sustancias con valores de EDE alrededor de -10Kcal/mol y $PI < -36\text{Kcal/mol}$ siguen mecanismos TAH. Las reacciones TAH son rápidas, independientes del pH y el solvente, pero sensibles a la presencia de metales y agentes reductores los cuales pueden generar una aparente mayor reactividad del antioxidante.

Método CARO (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno), conocido en inglés como ORAC (oxygen radical absorbance capacity) y método PATAR (Parámetro Antioxidante Total de Atrapamiento de Radicales), conocido en inglés como TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter)

Estos métodos están basados en los trabajos de Wayner y Glazer^{55,56} y perfeccionados por Cao⁵⁷. En general, miden la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo y reflejan un mecanismo clásico de actividad mediada por antioxidantes terminadores de cadena mediante TAH⁵⁸.

Como se muestra en la ecuación 9, el radical peroxilo es generado de una fuente como AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), el cual sufre una descomposición térmica para producir nitrógeno molecular y radicales alquilo, que en presencia de oxígeno generarán radicales peroxilo, los cuales reaccionan con una sonda coloreada o fluorescente para formar un producto incoloro o no fluorescente, como se muestra en la ecuación 10. La capacidad antioxidante es determinada por la disminución en la velocidad de degradación de la sonda debido a la reacción de los radicales peroxilo con el antioxidante para generar un producto no radicalario, como se muestra en la ecuación 11. En CARO, generalmente se utiliza fluoresceína como sonda y la reacción suele llevarse por extensos períodos de tiempo (>30 minutos) para garantizar la estabilización de la reacción. Como se muestra en la figura 5, los cálculos para expresar los resultados se obtienen de la integración del Área Bajo la Curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia calculando el valor de $ABC_{\text{neto}} = ABC_{\text{con antioxidante}} - ABC_{\text{sin antioxidante}}$; se

obtiene así información con respecto a parámetros cinéticos como tiempo de inducción y velocidad inicial en un solo parámetro. Generalmente, el resultado se expresa en términos de equivalencia de Trolox (análogo de vitamina E), para lo cual se construye una curva con diferentes concentración y las respectivas ABC de Trolox, que genera una curva de calibración que permite interpolar el ABC de la muestra y expresar su capacidad antioxidante en términos de cantidad equivalente a Trolox.

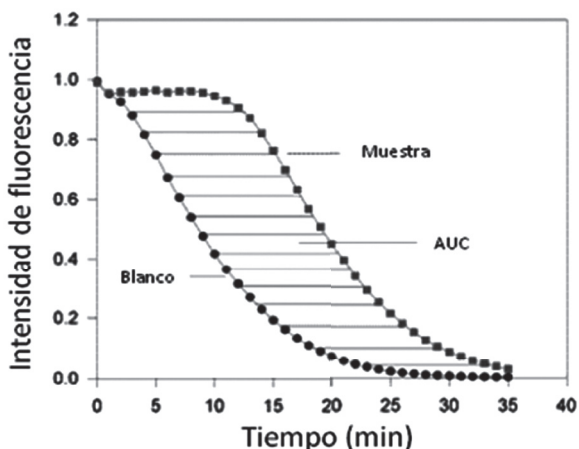
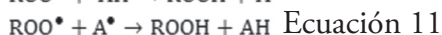
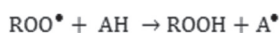
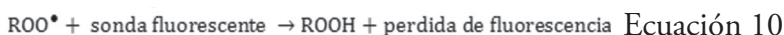


Figura 5. Curva de decaimiento de la fluorescencia por oxidación con radicales peroxil en un típico ensayo CARO donde se observa el efecto de un antioxidante (muestra) visto como el aumento en el Área Bajo la Curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia.

Métodos basados en la transferencia de electrones (TE)

Estos métodos determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. Describen reacciones más lentas que las TAH y por esto los cálculos de actividad antioxidante se basan en porcentajes de disminución en los productos más que en cinéticas de reacción. La reactividad relativa de un antioxidante en un método TE está basada, fundamentalmente, en la desprotonación y por lo tanto es gover-

nada por el Potencial de Ionización (PI)⁵⁹, de tal manera que los valores de PI disminuyen con el aumento del pH, reflejando el incremento en la capacidad electrodonante con la desprotonación y por lo tanto, compuestos con $PI > -45$ Kcal/mol siguen un mecanismo predominantemente tipo TE. En general, se ha correlacionado el potencial redox con un mecanismo tipo TE⁶⁰.

Los métodos TE son bastante sensibles a ácido ascórbico y ácido úrico, dos sustancias reconocidas por mantener el estado redox en plasma, además pueden detectar el poder reductor de polifenoles. Como en los métodos TAH, los metales pueden generar interferencia causando variabilidad e inconsistencias en los resultados.

CRHF (Capacidad para Reducir el Hierro Férrico), conocido en inglés como FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

El método CRHF fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain para medir el poder reductor del plasma⁶¹; sin embargo, posteriormente fue adaptado para medir actividad antioxidante de productos fitoterapéuticos y nutraceuticos⁶². Como se muestra en la figura 6, la reacción mide la reducción de 2,4,6-Tripiridiltriazina Férrica (TPTZ) a un producto coloreado y detecta compuestos con potenciales redox < 0.7 V. Se cree que el poder reductor está correlacionado con el grado de hidroxilación y conjugación en polifenoles; sin embargo, CRHF no puede detectar compuestos que actúan por mecanismo TAH, subestimando el potencial antioxidante de mezclas que contengan, por ejemplo, tioles.

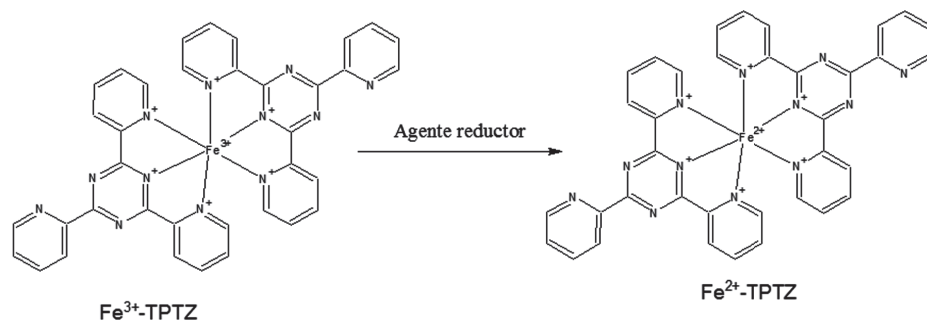


Figura 6. Fundamento del método CRHF, mostrando la reducción de 2,4,6-Tripiridil-Triazina Férrica (TPTZ).

Se ha argumentado que la capacidad para reducir el hierro se correlaciona poco con la estabilización de radicales libres; sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena y por lo tanto el poder reductor reflejaría la capacidad de un compuesto para regular el estado redox del plasma o tejidos. El método CRHF sigue un mecanismo típicamente TE y, por lo tanto, en combinación con otros métodos puede ser útil para distinguir el mecanismo dominante de diferentes antioxidantes. Adicionalmente, como los metales reducidos son propagadores de reacción en cadena de peroxidación lipídica por el rompimiento de hidroperóxidos a radicales alcoxilo, esto podría ser interesante para evaluar si altos valores CRHF correlacionan con la tendencia de algunos antioxidantes para actuar como prooxidantes bajo algunas condiciones⁶³.

Métodos que combinan mecanismos TAH y TE

Algunos métodos ampliamente usados como el ABTS y el DPPH se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. Sin embargo, se ha mostrado que estos radicales pueden ser estabilizados tanto por mecanismos TAH como TE y, por lo tanto, los patrones de reactividad y el mecanismo son difíciles de interpretar cuando no se conoce la estructura química del antioxidante evaluado.

a) Método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico)

Este método fue reportado inicialmente por Miller y colaboradores⁶⁴, y se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS^{•+}, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- acido sulfónico)) (Figura 7) por metamioglobina y peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

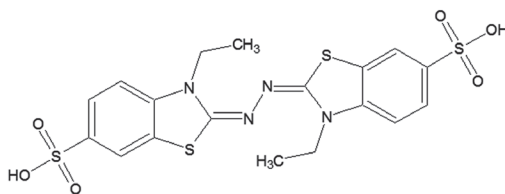


Figura 7. Estructura química del ABTS

Entre las ventajas de este método está que los valores de TEAC de una amplia gama de alimentos están reportados⁶⁵ lo que permite establecer comparaciones; adicionalmente puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica, además de que el ABTS^{•+} es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Entre las desventajas están que el ABTS^{•+} debe ser generado previamente, que no es un radical fisiológico y que la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de manera arbitraria.

b) Método DPPH (Difenil Picril Hidrazilo)

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand–Williams⁶⁶. El DPPH[•] (figura 8) es uno de los pocos radicales orgánicos estable, presenta una fuerte coloración violeta, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado *in situ* como el ABTS^{•+}. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH[•]; esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo TE, con un aporte marginal de TAH⁶⁷.

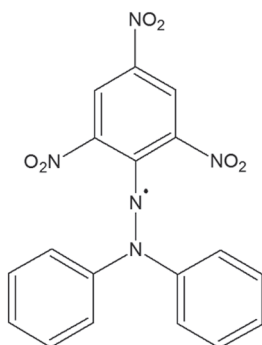


Figura 8. Estructura química del radical libre metaestable DPPH

Los resultados se suelen expresar como EC₅₀, es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH[•]. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia anti-radicalaria (EA) basada en la cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto.

Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical; adicionalmente el DPPH[•] es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH[•], debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad.

Otros métodos para determinar actividad antioxidante

a) Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es un procedimiento reportado recientemente como una herramienta promisoría para evaluar actividad antioxidante^{68, 69}. En este método, la muestra es introducida en una celda con un sistema de tres electrodos: electrodo de trabajo (por ejemplo carbono vítreo), electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) y electrodo auxiliar (platino). El potencial es aplicado bidireccionalmente al electrodo de trabajo a una velocidad constante (100 mV/s, generalmente), detectando el flujo de corriente (voltamograma cíclico). El poder reductor de una muestra está compuesto por dos parámetros: el pico de potencial (E_p) y la corriente anódica (CA). El E_p se mide como el potencial en la mitad de la corriente de cada onda anódica y cuando es calculado de esta forma se expresa como ($E_{1/2}$). En general un bajo valor de $E_{1/2}$ significa una mayor capacidad de la sustancia para donar electrones al electrodo de trabajo. Por su parte, la CA correlaciona con la concentración de la sustancia que está siendo evaluada; adicionalmente, la reversibilidad del proceso de óxido-reducción se puede determinar por la aparición de picos anódicos y catódicos, y es un buen antioxidante aquel que presenta procesos anódicos irreversibles⁷⁰. Los estudios de voltametría cíclica aplicados a mezclas complejas no permiten la determinación de antioxidantes individuales pero dan información valiosa acerca de la cantidad de grupos funcionales responsables de los picos en el voltamograma^{71, 72}. Entre las desventajas del método está que no todos los antioxidantes comunes donan electrones a los electrodos de carbono usados en estos ensayos; por ejemplo, compuestos tipo tiol no son detectados de esta forma y requieren electrodos de Au/Hg.

b) Método de Folin-Ciocalteu

La determinación del contenido total de compuestos fenólicos, utilizando el método originalmente propuesto por Folin en 1927 y modificado por Singleton y Rossi⁷³, no es considerada en sí misma una metodología para medir actividad antioxidante, a pesar de que su principio se basa en la capacidad redox de los polifenoles. Sin embargo, la alta correlación de los resultados con otros métodos como CARO y DPPH ha hecho que este método se popularice como una herramienta simple y rápida para predecir actividad antioxidante, principalmente en matrices complejas, donde la cantidad de compuestos fenólicos más que la composición específica de estas sustancias determinan la actividad antioxidante⁷⁴.

El método se fundamenta en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del polianión molibdotungstosfosfórico para generar un producto coloreado con un máximo de absorción a 765 nm.

Una de las modificaciones al método propuesta por Singleton implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (EGA). Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecúico y ácido ferúlico, lo cual imposibilita la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura⁷⁵.

Pese a esto, actualmente el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, principalmente en complemento con otros métodos para medición de actividad antioxidante, puesto que ya se conoce el valor de EGA para una amplia cantidad de frutas, vegetales, bebidas⁷⁶; por lo tanto, es posible la comparación de una muestra con estos datos, siempre y cuando se sigan los procedimientos reportados.

En este trabajo se utilizará una combinación de métodos con diferentes mecanismos, entre ellos Folin-Ciocateau, voltametría cíclica e inhibición de la peroxidación lipídica sobre LDL como sustrato oxidable.

Conclusiones

- El auge cada vez más creciente de alimentos, fitoterapéuticos, nutracéuticos y suplementos dietarios con promesas de actividad antioxidante,

unido a que los métodos existentes generan resultados inconsistentes que no presentan equivalencias entre unos y otros, además de que la interpretación de las conclusiones, en algunos casos, va más allá del alcance de los resultados, obliga al planteamiento de métodos para determinar esta actividad que puedan ser estandarizados como procedimientos de rutina.

- En la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante podría plantearse que las siguientes son las características que determinan esta actividad: 1) reactividad química del antioxidante, 2) capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y 3) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres.

Referencias bibliográficas

1. CAMERON, Ewan and PAULING, Linus. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. September 1978. Vol 75, no. 9. p. 4538 - 4542.
2. WILLETT, Walter and MacMAHON, Brian. Diet and cancer--an overview (second of two parts). En: The New England Journal of Medicine. March 1984. N° 310. p. 697-703.
3. RADIMER, Kathy; *et al.* Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. En: American journal of epidemiology. 2004. Vol. 160, no. 4. p. 339-349.
4. VALKO, Mirian; *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. En: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007. Vol. 39, no. 1. p.44-84.
5. Ibid., p.44-84
6. LIMÓN-PACHECO, Jorge y GONSEBATT BONAPARTE, Maria Eugenia. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. En: Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. March 2009. Vol. 674, no. 1-2. p.137-47.
7. ROBERFROID, Marcel y CALDERON, Pedro. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. 1 ed. New York: CRC, 1994.
8. Ibid., 280 p.
9. VALKO, Mirian; *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease., Op. cit., p.44-84
10. ROBERFROID, Op. cit.

11. VALKO, Mirian; *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. En: *Chemico-Biological Interactions*. March 2006. Vol. 160, no. 1. p. 1-40.
12. ROBERFROID, Op. cit.
13. GOMES, Ana; FERNANDES, Eduarda y LIMA, José. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. En: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. December 2005. Vol. 65, no. 2-3. p. 45-80.
14. VALKO, Mirian; *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, Op. cit., p.44-84
15. ROBERFROID, Op. cit.
16. STEPHENS, Caroline, FAWCETT, Tonks. Nitric oxide and nursing: a review. *Journal of clinical nursing*. January 2007. Vol. 16, no.1. p. 67-76.
17. DRÖGE, Wulf. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. En: *Physiological Reviews*. January 2002 vol. 82 no. 1. p. 47-95
18. GOMES, Ana, Op.cit. p. 45-80.
19. LIMÓN-PACHECO, Jorge, Op. cit. p.137-47.
20. Ibid., p.137-47.
21. ROBERFROID, Op. cit.
22. TRABER, Maret and ATKINSON, Jeffrey. Vitamin E, antioxidant and nothing more. En: *Free Radical Biology and Medicine*, July 2007. Vol. 43, no. 1, p. 4-15.
23. ROBERFROID, Op. cit.
24. GRIFFITHS, H.R. and LUNEC, J. Ascorbic acid in the 21st century - more than a simple antioxidant. En: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. September 2001. Vol. 10, no. 4. p. 173-182.
25. KRINSKY, Norman. Antioxidant functions of carotenoids. En: *Free radical biology & medicine*. 1989. Vol. 7, no. 6. p. 617-635
26. TIWARI, Ashok. Imbalance in antioxidant defence human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current Science*. November 2001. Vol. 81, no. 9. p. 1179-1187.
27. LOTITO, Silvina and FREI, Balz. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. En: *Free radical biology & medicine*. December 2006. Vol. 41, no. 12. p. 1727-1746
28. BORS, Wolf and SARAN, Manfred. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. En: *Free radical research communications*. 1987. Vol. 2, no. 4-6. p. 289-94.

29. MANACH, Claudine; *et al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. En: The American journal of clinical nutrition. 2005. Vol. 81. p. 230-242.
30. KNEKT, Paul; *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. En: The American journal of clinical nutrition. September 2002. Vol. 76, no. 3. p. 560-568.
31. ARTS, Ilja and HOLLMAN, Peter. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. En: The American Journal of Clinical Nutrition. January 2005. Vol. 81, no. 1. p. 317S-325S.
32. AVIRAM, Michael and FUHRMAN, Bianca. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. En: Annals of the New York Academy of Sciences. May. 2002. Vol. 957. p. 146-61.
33. RIETVELD, Anton and WISEMAN, Sheila. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. En: The Journal of nutrition. October 2003. Vol. 133, no. 10. p.3285-3292.
34. ROGINSKY, Vitaly and LISSI, Eduardo. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. En: Food Chemistry. September 2005. Vol. 92, no. 2. p. 235-254
35. ROGINSKY, Vitaly; *et al.*. Substituted p-hydroquinones as inhibitors of lipid peroxidation. En: Chemistry and physics of lipids. September 2003. Vol. 125, no. 1. p. 49-58
36. PRIOR, Ronald; WU, Xianli and SCHAICH, Karen. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53, no. 10. p. 4290-4302.
37. Ibid., p. 4290-4302.
38. ROGINSKY, Vitaly and LISSI, Eduardo., Op. Cit., p. 235-254
39. PRIOR, Ronald. Op. cit., p. 4290-4302.
40. CADENAS, Enrique. Basic mechanisms of antioxidant activity. En: BioFactors. January 1997. Vol. 6, no. 4. p.391-397.
41. PINCHUK, Ilya and LICHTENBERG, Dov. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. En: Progress in lipid research. July 2002. Vol. 41, no. 4. p. 279-314
42. ANTOLOVICH, Michael; *et al.* Methods for testing antioxidant activity. The Analyst. 2002. Vol. 127, no. 1. p. 183-198.
43. ROGINSKY, Vitaly and LISSI, Eduardo., Op. Cit., p. 235-254
44. KISHIDA, Etsu; *et al.* Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. Vol. 41, no. 10. p. 1598-600.

45. TULENKO, Thomas SUMNER, Anne. The physiology of lipoproteins. En: Journal of Nuclear Cardiology. 2002. Vol. 9, no. 6. p.638-649.
46. CHISOLM, Guy and STEINBERG, Daniel. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Free Radical Biology and Medicine. June 2000. Vol. 28, no. 12. p. 1815-1826.
47. GUY, Rebecca; *et al.* Characterization of peroxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36. En: Atherosclerosis. March 2001. Vol. 155, no. 1. p.19-28,
48. TROSTCHANSKY, Andrés; *et al.* Formation of Lipid-Protein Adducts in Low-Density Lipoprotein by Fluxes of Peroxynitrite and Its Inhibition by Nitric. En: Archives of Biochemistry and Biophysics. November 2001. Vol. 395, no. 2. p. 225-232.
49. MOREL, Diane. DICORLETO, Paul and CHISOLM, Guy. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. En: Arteriosclerosis. 1984. Vol. 4. p. 357-64.
50. HEINECKE, Jay; ROSEN, Henry and CHAIT, Alan. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. En: The Journal of clinical investigation. 1984. Vol. 74. p.1890-1894.
51. BECKMAN, Joseph and KOPPENOL, Willem. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. En: The American journal of physiology. November 1996. Vol. 271. p.1424-1437.
52. DAUGHERTY, Alan; *et al.* Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. En: The Journal of clinical investigation July 1994. Vol. 94. p.437-44.
53. HARDUIN, Pascal; *et al.* Immunological and functional properties of in vitro oxidized low density lipoprotein. En: Journal of lipid research. 1995. Vol. 36. p. 919-30.
54. WRIGHT, James; JOHNSON, Erin, And DILABIO, Gino. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. En: Journal of the American Chemical Society. 2001. Vol. 123, no. 6. p. 1173-1183.
55. WAYNER, D.D.; *et al.* Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. En: FEBS letters. July 1985. Vol. 187, no. 1. p. 33-37
56. GLAZER, Alexander. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. En: The FASEB journal: official publication of

- the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1988. Vol. 2. p. 2487-2491.
57. CAO, Guohua; SOFIC, Emin and PRIOR, Ronald. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. En: Free Radical Biology and Medicine. 1997. Vol. 22, no. 5. p. 749-760
 58. OU, Boxin; *et al.* Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. En: Journal of agricultural and food chemistry. 2001. Vol. 49. p. 4619-26.
 59. WRIGHT; Op. cit. p. 1173-1183.
 60. HUANG, Dejian; OU, Boxin and PRIOR, Ronald. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53, no. 6. p. 1841-56.
 61. BENZIE, Iris and STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. En: Analytical Biochemistry. 1996. Vol. 239. p. 70-6.
 62. BENZIE, Iris and SZETO, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. En: Journal of agricultural and food chemistry. 1999. Vol. 47. p. 633-636.
 63. CAO, Op. cit., 749-760
 64. MILLER, N. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. En: Clinical science (London, England). 1993. vol. 84. p. 407-412.
 65. PIETTA, Piergiorgio; *et al.* Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. Vol. 23. p. 223-226.
 66. BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, ME, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: LWT - Food Science and Technology. 1995. Vol. 28, no. 1. p. 25-30.
 67. HUANG, Op. cit., p. 1841-56.
 68. FIRUZI, Omidreza. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. January 2005. Vol.1721, no. 1-3. p. 174-184
 69. PRIOR, Ronald and CAO, Guohua. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. En: Free radical biology & medicine. December 1999. Vol. 27, no. 11-12, p. 1173-1181
 70. KILMARTIN, Paul; ZOU, Honglei and WATERHOUSE, Andrew. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine

- and wine phenolics. En: Journal of agricultural and food chemistry. 200. Vol. 49, no. 4. p. 1957-1965.
71. COSIO, Maria Stella. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. Food Chemistry. 2006. Vol. 97. p. 725-731.
 72. BARROS, Lillian; *et al.* Antioxidant activity of Agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. En: Food Chemistry. November 2008. Vol. 111, no. 1. p. 61-66
 73. SINGLETON, V. and ROSSI, J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic. 1965. Vo. 16. p. 144-158.
 74. TAWAHA, Khaled. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. En: Food Chemistry. 2007. Vol. 104. p. 1372-1378.
 75. PRIOR. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Op. cit., p. 4290-302.
 76. BRAT, Pierre. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. En: The Journal of nutrition. September 2006. Vol. 136. p. 2368-2373.