



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Métodos Analíticos para la
Determinación de Antioxidantes en Muestras
Biológicas**

Autor: Huet Breña, Cristina

Tutor: María Antonia Martín Carmona

Convocatoria: Febrero 2017

RESUMEN

Introducción y Antecedentes: la formación de radicales libres en los organismos vivos es un proceso natural tan deseable como la fagocitosis o la formación de colágeno, ya que contribuye a mantener la homeostasis. El equilibrio entre a) los radicales y especies reactivas en general, y b) los antioxidantes, debe mantenerse para evitar que produzcan más radicales, y con ello, se desajuste dicho equilibrio conduciendo a padecer diversas patologías como: diabetes, cáncer, hipertensión, aterosclerosis... **Objetivos:** revisión y descripción de los métodos más relevantes que existen actualmente para determinar la capacidad antioxidante “in vitro” e “in vivo” frente al estrés oxidativo. **Metodología:** se realizó una revisión bibliográfica a través de de diferentes bases de datos como Google Académico, Science Direct, SciELO. **Resultados y Discusión:** la capacidad antioxidante se puede medir de diversas formas, dos sobresalen: la capacidad total de una muestra como ORAC, FRAP, TEAC, TRAC; o la capacidad antioxidante específica de diferentes sustancias, ya sea con actividad enzimática: SOD, CAT, GP, GR; o bien no enzimáticas: glutatión y vitaminas C y E. **Conclusiones:** en la actualidad se siguen buscando o mejorando métodos para determinar la capacidad antioxidante de muestras biológicas. No hay que olvidar que el la mejor forma de disminuir el riesgo de desarrollar una de estas patologías es llevar una estilo de vida saludable.

Palabras claves: radicales libres, capacidad antioxidante, especies reactivas de oxígeno, ORAC, FRAP, TEAC,TRAC, SOD, CAT, GP, GR.

INDICE

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

OBJETIVOS

METODOLOGÍA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos para medir la capacidad antioxidante total

ORAC, TRAP, TEAC, FRAP

Métodos para medir la capacidad antioxidante específica

Enzimáticos: SOD, GPx, GR, CAT

No enzimáticos: Glutación, vitamina C, vitamina E

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los antioxidantes son compuestos capaces de proteger los sistemas biológicos contra las reacciones y/o procesos que puedan producir un efecto potencialmente dañino, como es el caso de las especies reactivas de oxígeno (EROS o ROS) o de nitrógeno (ERN o NOS). (Karadag *et al.*, 2009), debido a que estas especies son inestables y muestran una elevada reactividad que en muchos casos se manifiesta como simple reacción química que determina una secuencia de reacciones manifestadas como una agresión y posteriormente una patología.

La producción de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres son un proceso natural del metabolismo celular; sin embargo, la exposición a contaminante, medioambiente, estilo de vida, y situaciones patológicas, pueden generar un exceso o acumulación de los mismos. (Sánchez Valle *et al.*, 2013)

En el desarrollo normal de las células del organismo se producen diferentes reacciones metabólicas para crecer y desarrollarse. En dichos procesos se generan de forma espontánea diferentes productos entre los cuales podemos encontrar radicales libres que posteriormente serán eliminados por los antioxidantes. Los radicales libres se pueden formar mayoritariamente en la mitocondria (cadenas transportadoras de electrones), peroxisomas, células del sistema inmunitario (como los macrófagos, leucocitos, neutrófilos, para defender al organismo frente a los patógenos externos), por la acción de diferentes enzimas que participan en las cadenas redox, como: el citocromo P450, xantina oxidasa, NADPH oxidasa... (Rodríguez Perón *et al.*, 2001)

La dieta, estilo de vida, exposición a las radiaciones, contaminantes atmosféricos, metales, pesticidas, tóxicos, humo de tabaco y algunos medicamentos están asociadas a un fenómeno conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes (principalmente Especies Reactivas del Oxígeno, EROs) y/o una disminución/afectación en los mecanismos de detoxificación de ellas. El incremento de las EROs promueve la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento. (Londoño Londoño, 2012)

Entre las especies reactivas, las cuales pueden estar en forma radicalaria o no, podemos encontrar: a) las EROs (O_2^- , $OH\cdot$, $OH_2\cdot$, $RO_2\cdot$, $RO\cdot$, O_2 (singlete), H_2O_2 , $HOBr$, $HOCl$, O_3 , $ROOH$) o b) las ERNs (las especies reactivas de nitrógeno $NO\cdot$, NO_2 , NO_3 ,

Antioxidantes

Los antioxidantes, moléculas capaces de captar el electrón desapareado del orbital externo de los radicales libres y de esta forma desactivarlos, disminuyen el estrés oxidativo y actúan sobre el mismo inhibiéndolo, para evitar la oxidación de las proteínas, los lípidos y el ADN. Las alteraciones en estas biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo producirán el desarrollo de patologías siendo las más relevantes diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson y Alzheimer, o incluso cáncer, como se indica en la Figura 1. (Barbosa, 2008; Sánchez Valle *et al.*, 2013)

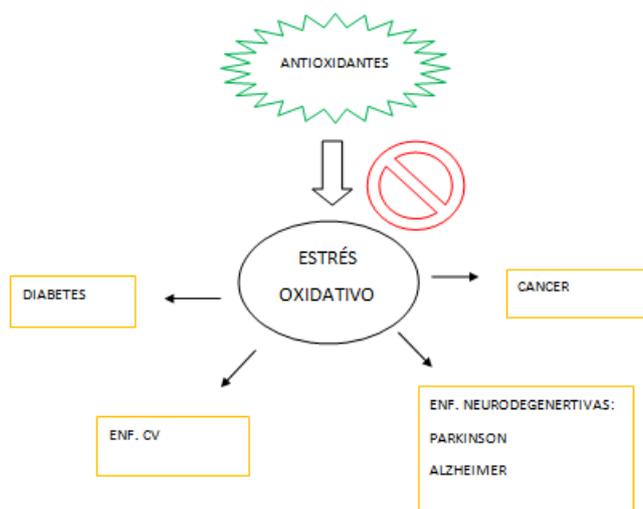


Figura 1: Inhibición del estrés oxidativo, los cuales están relacionadas con el desarrollo de diversas patologías, por parte de los antioxidantes.

La clasificación de los antioxidantes según el mecanismo de acción realizada por de Guttridge y Mitchell distingue:

- a) Primarios, previene la formación de RL (radicales libres)
 - b) Secundarios, inactivan los RL (radicales libres) ya formados
 - c) Terciarios, reparan el daño oxidativo principalmente el ocasionado al ADN.
- (Moragón, 2007)

Los antioxidantes de prevención impiden la formación de los radicales libres mediante la descomposición del H_2O_2 o la quelación de los metales (que participan de las cadenas redox por sus características oxido/reductoras). Algunos de estos antioxidantes son enzimas como las catalasas, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, transferrina o ceruloplasmina. Los eliminadores/secuestrantes de radicales libres (scavenger) inhiben el inicio de la cadena redox y rompen la su propagación. Entre estos podemos encontrar las vitaminas A, C y E, la coenzima Q_{10} , y los flavonoides y polifenoles. Y por último los de reparación o “síntesis de novo” reparan

los daños y la reconstrucción de la membrana como es el caso de los enzimas de reparación del ADN, proteasas y transferrinas. (Polo de Santos, 2016)

Los radicales libres al igual que los antioxidantes se pueden encontrar en el citosol, núcleo, cadena respiratoria mitocondrial, sistema retículo-endotelial (RE), lisosoma, peroxisoma, cadenas de transporte a nivel microsomal, cloroplastos.

Tabla 1: Clasificación de principales antioxidantes (Amazán, 2013; Mayor, 2010; Moragón, 2007; Olivares, *et al.*, 2010; Prior *et al.*, 1999; Venereo, 2002):

ACCION	INTRACELULAR		MENBRANA		EXTRACELULAR		INDEFINIDO/ TODOS	
ORIGEN	Antioxidante/ localización	Acción	Antioxidante/ localización	Acción	Antioxidante / localización	Acción	Antioxidante / localización	Acción
EXOGENO no enzimáticos	Vit. C (Ac. Ascórbico) (hidrosoluble) LISOSOMA	-Neutraliza el oxígeno singlete -Captura radicales libres hidroxilo -Captura o_2 -Regenera la forma oxidada de la vit. E	Vit. E (α - tocoferol) (liposoluble) NUCELO RETICULO ENDOTELIAL LISOSOMA Comp. fenolicos solubles en lípidos, loc en menb.	-Neutraliza el oxígeno singlete -Captura radicales libres hidroxilo -Captura o_2 -Neutraliza peróxidos - Principal antioxidante que bloquea la etapa de propagación de la peroxidación lipídica de AGPI, membrana lipídica	Vit. E (α - tocoferol) (Liposoluble) NUCELO RETICULO ENDOTELIAL LISOSOMA Comp fenolicos solubles en lípidos, loc en menb.	-Neutraliza el oxígeno singlete -Captura radicales libres hidroxilo -Captura o_2 -Neutraliza peróxidos - Principal antioxidante que bloquea la etapa de propagación de la peroxidación lipídica de AGPI, menbran lipídica	Flavonóides (polifenoles)	-Quelan metales.
			B-carotenos (pro- vit A) (liposoluble) NUCLEO RE LISOSOMA	- Neutraliza el oxígeno singlete - Protege al DNA, detiene el deterioro de tejidos.	Vit. C (Ac. Ascórbico) (hidrosoluble) LISOSOMA	-Neutraliza el oxígeno singlete -Captura radicales libres hidroxilo -Captura o_2 -Regenera la forma oxidada de la vit. E	Licopeno (liposoluble)	
ENDÓGENOS enzimáticos	Superóxido dismutasa (SOD) CITOSOL MITCONDRIA	-Cofactor: Cu, Mn -Elimina el anion peroxido					Glutatión peroxidasa (GPx) CITOSOL LISOSOSOMAS	-Cofactor: Se - Previene la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo
	Catalasa (CAT)	-Cofactor: Fe						

	PEROXISOMA	- Previene la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo						
ENDOGENOS No Enzimáticos	Glutación (GSH) CITOSOL MITOCANDRIA	-Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células -Captura radicales libres hidroxilo -Captura o_2					Ác. Tioctico	-Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)
							Coenzima Q	
Indefinido /ambos	Peroxidasa		Ubiquinol-10		Ácido úrico no enzimático	Producción de peroxidación lipídica		
	Proteínas que ligan metales				Lactoferrinas No enz	-Quelante del ion Fe^{3+}		
	Sistemas proteolíticos				Transferrinas No enzimático	-Quelante y transportador del ion Fe^{3+}		
					Ceruloplasmina No enzimático	-Quelante y transportador del ion Cu^{3+}		
					Albúminas no enzimático			
					Haptoglobinas			

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de fin de grado se centran en describir cuales son los métodos analíticos mas usados para la cuantificación y determinación de la capacidad antioxidante total de diferentes antioxidantes en las muestras biológicas, entre las que se encuentran muestras de saliva, sangre, suero, plasma, orina. Por lo tanto, servirá para cuantificar la capacidad del organismo para responder ante los diferentes daños, ya sean externos (como medicamos, tóxicos entre otros) o internos (procesos metabólicos o de defensa), los cuales pueden llegar a generar diferentes patologías en el organismo.

No se tendrá en cuenta aquellas pruebas que determinan la capacidad antioxidante en muestras que solo sirvan para cuantificar esta capacidad antioxidante en muestras de suelo, agua, aire, plantas, alimentos, bebidas, etc.

El segundo objetivo será cuantificar la capacidad antioxidante específica de otros antioxidantes que podemos encontrar en los seres vivos, ya sea enzimas como SOD (superóxido dismutasa), GPx (Glutation peroxidasa), GR (Glutation reductasa), CAT (catalasa) u otros no enzimáticos como glutatión y las vitamina C y E.

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este estudio, una revisión bibliografía, se llevo a cabo una búsqueda a través de diferentes bases de datos como Google Académico, Science Direct, SciELO.

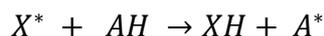
La búsqueda se especificó palabras claves, ya fueren en ingles o español, de “capacidad antioxidante”, “sangre”, “plasma”, “orina”, “actividad antioxidante”, o directamente indicando el método o la enzima o antioxidante a estudiar como “ORAC”, “FRAD”, “TRAP”, “TEAC”, “SOD”, “CAT”, “GP” entre otros.

Para evitar posibles errores y obtener resultados de mediciones de la capacidad o actividad antioxidantes que no correspondieran al análisis de animales, se especificó la exclusión de términos como cualquier tipo de planta, alimento, bebida, etc.

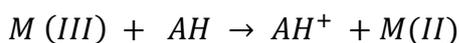
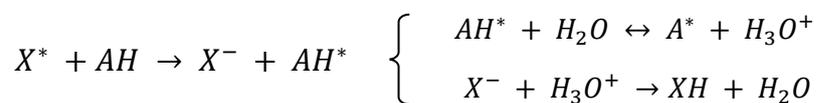
Por último, no hay que olvidar que aunque la obtención de resultados sea muy amplia, a veces no se obtiene un acceso total y libre a todos esos posibles artículos que obtenemos en un principio por lo que la revisión bibliográfica no llega a ser tan exacta y detallada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen dos mecanismos por los cuales los antioxidantes pueden actuar son mediante transferencia de átomos de hidrogeno o mediante la transferencia de electrones. La transferencia de átomos de hidrogeno o HAT se representa por la siguiente reacción donde X^* es el radical y AH el antioxidante; el radical A^* es mas estable que el inicial. (Pérez Jiménez, 2007)



En el caso de de la reacciones de transferencia de electrones el antioxidante transfiere un electrón para reducir el compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales siguiendo la siguiente reacción (Pérez Jiménez, 2007):



Métodos para medir la capacidad antioxidante total en muestras biológicas

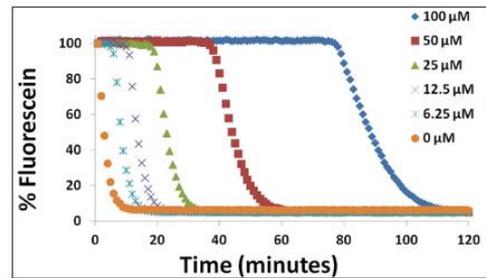
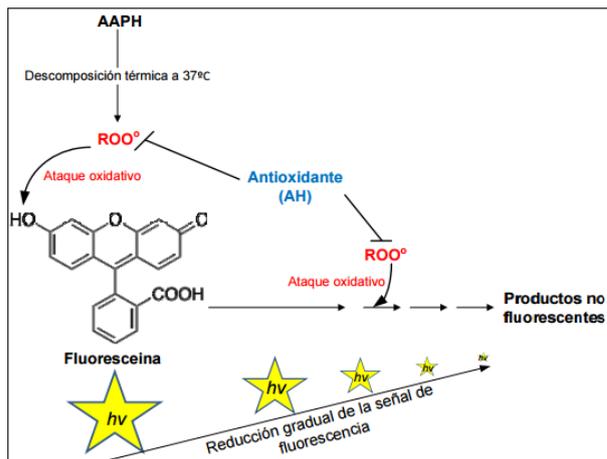
A) Secuestradores de radicales

A.1) Secuestradores radicales peroxilo

- Ensayo de transferencia de átomos de hidrogeno

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity o Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

Esta técnica determina la capacidad antioxidante mediante un método fluorimétrico. En primer lugar mediante la descomposición térmica de un azoderivado AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro) se generara un radical peroxilo. Este intentara oxidar un sensor/marcador oxidable y fluorescente (una proteína como la ficoeritrina o un sensor fluorescente como la fluoresceína) y por el contrario el antioxidante intentara evitar esta oxidación. A medida que el radical oxide el sensor fluorescente este irá perdiendo poco a poco su fluorescencia (dicha fluorescencia se registrara con un fluorimetro). (Karadag *et al.*, 2009; Niki, 2010)



En la Figura 2 se muestra como debido a la acción de los antioxidantes la fluorescencia se mantendrá en el tiempo ya que evita que el radical peroxilo reaccione con la fluoresceína y más adelante ya si irá perdiendo a la fluorescencia. (Pacheco, 2001)

Esta ralentización de la pérdida de fluorescencia se representa gráficamente en la Figura 3, en la que se observa como a medida que aumenta la concentración de antioxidante el descenso de las líneas (% fluorescencia) se va desplazando a la derecha, ya que tarda más tiempo en reaccionar. (Peter J., 2012)

Para calcular la capacidad antioxidante se tendrá en cuenta el rendimiento neto de en AUC (área bajo la curva) en un periodo de tiempo, es decir, el AUC en presencia de un antioxidante menos el AUC en ausencia del antioxidante. (Karadag *et al.*, 2009; Niki, 2010). Por lo tanto, combina porcentaje de inhibición y la duración de tiempo de inhibición de la acción de radicales libres por los antioxidantes en una única cantidad. (Cao *et al.*, 1998). Con la finalidad de poder comparar los resultados obtenidos, para distintas muestras y matrices se emplea un patrón interno que es un análogo de vitamina E y se expresara en equivalentes de Trolox (análogo de la vitamina E), un antioxidante estándar generalmente utilizado como valor de referencia. (Shahidi *et al.*, 2015)

El método ORAC tiene una alta especificidad y responde a diversos antioxidantes en muestras biológicas de plasma y suero. Entre los antioxidantes que se puede cuantificar encontramos algunos proteicos como la albumina y otros no proteicos como vitaminas, ácido úrico y bilirrubina, otros compuestos puros que también puede determinar son la melatonina, dopamina o flavonoides. Sin embargo, uno de los inconvenientes frente a otros métodos es que el ensayo ORAC requiere ~ 60 min más de la FRAP o ensayo Randox-TEAC para cuantificar los resultados. (Cao *et al.*, 1998; Karadag *et al.*, 2009)

TRAP (Total radical trapping power o poder de captación de radicales totales)

Al igual que el método ORAC se utiliza un azo-iniciador como es el caso de AAPH o ABAP para generar los radicales peroxilos, pero en vez de medir la pérdida de fluorescencia se mide el oxígeno consumido durante la reacción.



A medida que se incorpore la muestra con antioxidantes se irá controlando el oxígeno consumido por el mismo. El periodo en el que la oxidación se inhibe por el antioxidante se compara con una muestra con el Trolox un antioxidante de referencia. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox (mmol de peroxilo capturado por molécula de Trolox/L plasma). esta prueba se puede realizar en plasma, suero o sangre. (Fernández Pachón *et al.*, 2006; Ugartondo, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2007)

Con este método podemos obtener resultados de antioxidantes como ascorbato, alfa- tocoferol, acido úrico e incluso antioxidantes con grupos tiol. Se considera un método simple, fiable y permite un manejo rápido de las muestras. Hay que tener en cuenta que existen posibles errores debido a la acción sinérgica entre algunos antioxidantes como es el caso de ascórbico y los derivados tiol que pueden hacer que se produzca una pérdida de capacidad antioxidante que si se midieran por separado. (Ghiselli *et al.*, 1995)

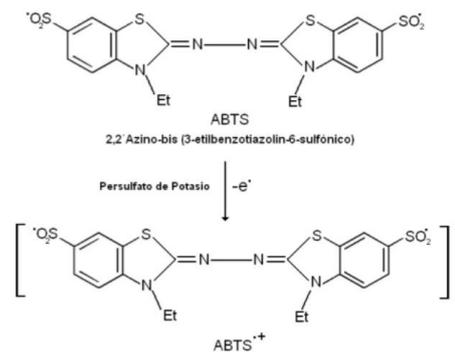
A.2) Secuestradores de radicales estables

-Ensayo de transferencia de electrones

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity o capacidad antioxidante de equivalentes al Trolox)

El ensayo TEAC es una técnica espectrofotométrica que se basa en la inhibición por parte de los antioxidantes de la absorbancia del catión radical de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), un cromóforo azul-verde y estable que tiene un espectro de absorción de longitud de onda larga característico. (Prior *et al.*, 1999; Shahidi *et al.*, 2015)

En primer lugar se generan cationes radicales de ABTS; a partir de peróxido de hidrogeno H_2O_2 u otros oxidantes fuertes como persulfato potásico en presencia de metamioglobina generan un radical intermedio ferrilmioglobina que luego reacciona con ABTS para formar el catión radical ABTS.



Formación del radical ABTS mediante el persulfato de potasio. (Santa Cruz Cifuentes, 2011)

A continuación los antioxidantes pueden neutralizar estos cationes radicales mediante la transferencia de electrones u átomos de hidrogeno (ET y HAT). Esto hace que el catión radical (cromóforo) vaya perdiendo coloración y por lo tanto la disminución de la absorción espectrofotométrica. El porcentaje de inhibición de la formación catión radical ABTS por la muestra antioxidante añadido en un punto de tiempo fijo se cuantifica como el resultado. Los cuales se expresan en equivalentes de Trolox(mmol de Trolox/L de muestra problema). Este método es aplicable para el estudio de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles. (Cao *et al.*, 1998; Shahidi *et al.*, 2015)

El tiempo de inhibición se fija en 3 min en el ensayo de Randox-TEAC, habitualmente se emplean 6 min como fue utilizado en el procedimiento original ensayo TEAC. Los kits comerciales para el ensayo TEAC eran caros; el coste de reactivos por muestra en el ensayo Randox-TEAC era ~ 9 veces mayor que en el ensayo ORAC. Sin embargo, el ensayo ORAC requiere un detector de fluorescencia y toma 70 min para completar.

Este método es útil con respecto a las actividades antioxidantes de fitoquímicos (flavonóides) en muestras de suero, saliva u orina. (Cao *et al.*, 1998)

FRAP ((Ferric ion Reducing Antioxidant Power o Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico)

El ensayo FRAP también se trata de un método espectrofotométrico que mide la reducción de un complejo formado por un cromógeno, normalmente de TPTZ (2, 4, 6-

tripiridil-s-triazina), y hierro férrico (Fe^{3+}) incoloro a un complejo ferroso Fe^{2+} de un intenso color azul verdoso en presencia de antioxidantes en un medio ácido. Es muy simple y barato, pueden reducir diferentes antioxidantes no enzimáticos como es el caso de vitamina C (ácido ascórbico) y otros como ácido úrico, entre otros; pero no mide los antioxidantes que contienen grupos SH, tal como el glutatión, ácido lipóico y algunos aminoácidos, ya que estos no reducen de forma efectiva el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Se utiliza en muestras de saliva, suero, plasma, orina o fluidos biológicos. (Cao *et al.*, 1998; Fernández Pachón *et al.*, 2006; Mora H., 2009)

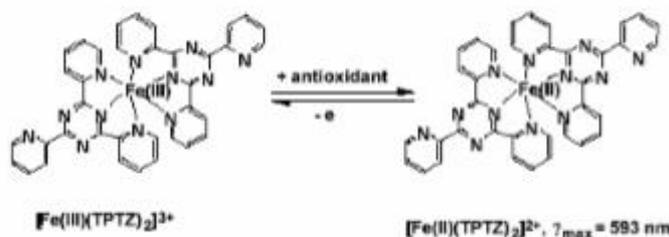


Figura 5: Reacción del complejo cromóforo de hierro tras actuar el antioxidante sobre este (pasando de Fe^{3+} a Fe^{2+}). (Pérez Jiménez, 2007)

La actividad antioxidante se determina como aumento de la absorbancia de forma lineal y los resultados se expresan como mg equivalentes de Fe^{2+} o micromolar de Fe^{2+}/L . (Antolovich *et al.*, 2002; Suarez, 2008)

B) Métodos para medir la capacidad antioxidante específica en muestras biológicas

B.1) Sistemas enzimáticos

Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria

Uno de los métodos utilizados para la determinación de la actividad enzimática de la SOD. Es un método espectrofotométrico que mide la actividad de la enzima por el grado de inhibición de la siguiente reacción. A partir de la xantina y xantina oxidasa (XO) se forman radicales superóxido, los cuales reaccionan con compuesto para formar un complejo coloreado. (Blanco Hernández *et al.*, 2004; Jimenez, V., 2013)

Se determina espectrofotométricamente la inhibición de la formación de dicho cromógeno debido a la eliminación del superóxido por acción de SOD, de esta manera

se obtendrá el porcentaje de inhibición del enzima. Los resultados se expresan en Unidades/mg de proteína por minuto. (Soto Castruita *et al.*, 2015; Jimenez, V., 2013)

Glutación peroxidasa GPX eritrocitaria

En este caso también se mide la disminución de absorción en un espectrofotómetro por un método indirecto. El glutación peroxidado GPx cataliza la oxidación del glutación GSH por el hidróxido de cumeno a glutación oxidado GSSG. Y este será convertido otra vez a glutación reducido por la enzima glutación reductasa GR con la ayuda de NADPH que se transformará a NADP⁺. (Blanco Hernández *et al.*, 2004)



La tasa de formación de GSH es monitoreada mediante la disminución de la absorbancia por el consumo de NADPH. La diferencia de consumo de de NADPH entre el blanco y la muestra determinara la activada enzimática, la cual será proporcional a la disminución de la absorbancia debido a la desaparición de NADPH. (Ceballos *et al.*, 1999; Floriano Sanchez, 2009)

Glutación reductasa GR

Este análisis se realiza utilizando una técnica espectrofotométrica. Dicho enzima necesita la acción del NADPH para producirse, esta transformación del NADPH en NADP es la que se detecta espectrofotométricamente para cuantificar la actividad del enzima. (Vasconcelos *et al.*, 2007)

Determinación de la actividad catalasa (CAT)

Una de las técnicas para determinar la actividad enzimática de la CAT es una técnica espectrofotométrica. El método de Aebi se fundamenta en la descomposición de H₂O₂ catalizada por la enzima catalasa. Para cuantificar la actividad del enzima se cuantifica la disminución de absorbancia debido a la disminución de H₂O₂ con respecto a una muestra con blanco. (Cárdenas, 2007)

B.2) Sistemas no enzimáticos

Glutación

La concentración total de glutación (GSH + GSSG) se puede medir usando diferentes métodos uno de los más utilizados es por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Que más tarde después de la separación serán detectados por absorbancia en el UV, detección por fluorescencia, detección electroquímica, y espectrometría de masas. (Vulcano *et al.*, 2013)

Vitamina C o Ascórbico.

El método estándar más utilizado para la separación y el análisis de la vitamina C es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Sin embargo, este método requiere equipos altamente especializados y un alto nivel de habilidad técnica. (Choy *et al.*, 2000)

Además, la detección de la vitamina C en el plasma o suero requiere precaución, ya que es un compuesto fácilmente oxidable. Debido a su facilidad de oxidación a neutral (fisiológica) o pH alcalino, se recomienda la acidificación plasma, preferiblemente después de su separación por centrifugación. (Vasconcelos *et al.*, 2007)

Vitamina E o Tocoferol

La medición de la vitamina E en suero, plasma, plaquetas y eritrocitos se realiza por una técnica cromatografía HPLC-RPC (cromatografía líquida de fase reversa). Los compuestos de la muestra se desplazaran dependiendo de la polaridad, los cuales se detectaran posteriormente mediante espectrofotometría y se cuantificaran tras la comparación de los picos con una muestra estándar. (Sánchez *et al.*, 2008)

CONCLUSIÓN

La formación de radicales libres en los seres vivos aunque pueden puedan verse favorecidas su formación por agentes exógenos, como el consumo de alimentos con alto contenido graso (hamburguesas y aderezadas), alimentos procesados (embutidos), fritos o asados o con conservantes, o el exceso de alcohol, elementos químicos (medicamentos, pinturas, humo del tabaco, herbicidas, metales pesados o radiaciones ionizantes(Olivares *et al.*, 2010); O endógenas mediante reacción metabólicas

necesarias para la vida, el organismo tiende a equilibrar esta balanza para evitar este estrés oxidativo mediante la acción de los antioxidantes.

Como hemos visto en este estudio existen varios métodos para determinar cómo los organismos vivos pueden actuar frente a estas sustancias y como medir su capacidad antioxidante mediante los métodos más relevantes. Esto no quiere decir, que en la actualidad existan otros métodos, incluso varios métodos para determinar, por ejemplo, la misma enzima.

A medida que la investigación aumente se siguen buscando nuevos métodos o mejorando los ya existentes más específicos, selectivos y fiables, evitando así los posibles errores de medición que aun podemos encontrar, para así poder cuantificar de manera más exacta cual es la capacidad antioxidante real.

El hecho de poder obtener resultados mas específicos, selectivos y fiables, nos ayudaran en un futuro a determinar qué factores pueden aumentar esta capacidad antioxidante para así incorporarlos a nuestros estilo de vida (alimentos como frutas y verduras) y como consecuencia, los diversos procesos patológicos como envejecimiento, aterosclerosis, cáncer, cataratas, insuficiencia renal, diabetes, hipertensión, cirrosis o neurodegenerativas como Alzhéimer o Párkinson (Guerra, 2001); se podrían ver disminuidos en nuestra sociedad.

Aunque no hay que olvidar que el hecho de obtener unos resultados elevados de antioxidantes no nos indica necesariamente un resultado positivo, al igual que uno disminuido no nos indica un resultado bajo no nos indica un resultado negativo. Siempre hay que tener en cuenta el equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes.

BIBLIOGRAFIA

AMAZÁN, Daniel. *Estudio de eficacia de una fuente de vitamina E natural (D- α -tocoferol) en ganado porcino*. 2013. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

ANTOLOVICH, Michael, Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. *Methods for testing antioxidant activity*. Analyst, 2002, vol. 127, no 1, p. 183-198.

BARBOSA, K. B. F., Bressan, J., Zulet, M. A., & Martínez, J. A. *Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos*. En *Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Gobierno de Navarra*. Departamento de Salud, 2008. p. 259-280.

BLANCO HERNÁNDEZ, Ricardo, Ruíz-Ramos, M., Sánchez-Rodríguez, M. A., & Mendoza-Núñez, V. M. *Lipoperóxidos, actividad antioxidante y factores pro-oxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2*. Bioquímica, 2004, vol. 29, no 4, p. 118-125.

CAO, Guohua; Prior, R. L. *Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum*. *Clinical chemistry*, 1998, vol. 44, no 6, p. 1309-1315.

CÁRDENAS FERNÁNDEZ, Anthony Max. *Oxidación de proteínas y lípidos en cerebro de cobayos durante la exposición a las grandes alturas (4540 m)*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2007.

CASTILLO SÁNCHEZ, Julián. *Estrés oxidativo, antioxidantes y salud*. Fundación de estudios, médicos de Molina de Segura, 2010

CEBALLOS, Alejandro, Wittwer, F. G., Contreras, P. A., Quiroz, E., & Böhmwald, H. *Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio*. *Pesq agropec bras*, 1999, vol. 34, p. 2331-2338.

CHOY, Camus Kar Man; Benzie, I. F. F., & Cho, P. *Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2000, vol. 41, no 11, p. 3293-3298.

FERNANDEZ PACHON, María Soledad, VILLAFIO, D., TRONCOSO, A. M., & García-Parrilla, M. *Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo*. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 2006, vol. 56, no 2, p. 110-122.

FLORIANO SANCHEZ, E. S. A. U. *Caracterización del estrés oxidativo y efectos del ácido nordihidroguayaretico en un modelo de ratas expuestas a ozono*. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional (IPN), 2009.

GHISELLI, Andrea, Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. *A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, vol. 18, no 1, p. 29-36.

GUERRA, JI Elejalde. *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. En *Anales de Medicina Interna*, 2001. p. 326-335.

JIMENEZ, V. *Evaluation of the oxidative stress modulation in Drosophila melanogaster strains deficient in endogenous antioxidants and with chronic exposure to casiopeina Cas II-gly and gamma radiation*. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Mexico, 2013.

KARADAG, Ayse, Ozcelik, B., & Saner, S. *Review of methods to determine antioxidant capacities*. *Food analytical methods*, 2009, vol. 2, no 1, p. 41-60.

LONDOÑO LONDOÑO, Julián. *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. En *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista, 2012.

MAYOR OXILIA, Rosa. *Oxidative stress and antioxidant defense system*. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 2010, vol. 5, no 2, p. 23-29.

MORA H, Ángela C. *Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina*. *Vitae*, 2009, vol. 16, no 3, p. 311-319.

MORAGÓN, Ángela Casado. *Termalismo y actividad física*. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), 2007.

NIKI, Etsuo. *Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, vol. 49, no 4, p. 503-515.

OLIVARES, Luis Delgado, Cabrera, G. B., & Martínez, M. T. S. *Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo*. *Investigación y Ciencia*, 2010, vol. 18, no 50, p. 10-15.

PACHECO, Elio Mujica. *Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2011.

PÉREZ GASTELL, Pedro Luis, de Alejo, P., & Luis, J. *Métodos para medir el daño oxidativo*. Revista Cubana de Medicina Militar, 2000, vol. 29, no 3, p. 192-198.

PETER J. Brescia. *Determinación del potencial antioxidante usando un análisis de capacidad de absorción Radical oxígeno (ORAC) con Synergy™ H4*. Biotek, 2012.

PÉREZ JIMÉNEZ, Jara. *Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2007.

PRIOR, Ronald L.; Cao, G. *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1*. Free Radical Biology and Medicine, 1999, vol. 27, no 11, p. 1173-1181.

PRIOR, Ronald L.; Cao, G. *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1*. Bio-Assays for Oxidative Stress Status, 2001, Pages 39-47

POLO DE SANTOS, M^a. *Estudio de la actividad antioxidante de las aguas mineromedicinales*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2016.

RODRÍGUEZ PERÓN, José Miguel; Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. *Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo*. Revista cubana de medicina militar, 2001, vol. 30, no 1, p. 15-20.

SÁNCHEZ M., Maribel C.; Rodríguez A., R. A.; Martín D., V, Sepúlveda P., L.E.; Sutil N, R.; Contreras Freddy; Mary Lare; Eukaris Maurera. *Estrés y vitaminas antioxidantes en pacientes diabéticos Tipo 2*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 2008, vol. 27, no 1, p. 59-65.

SÁNCHEZ VALLE, Vicente; Méndez-Sánchez, N. *Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad*. Revista de Investigación Médica Sur México, 2013, vol. 20, no 3, p. 161-168.

SANTA CRUZ CIFUENTES, Liliana Andrea. *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia, 2011.

SHAHIDI, Fereidoon, Zhong, Y. *Measurement of antioxidant activity*. Journal of functional foods, 2015, vol. 18, p. 757-781.

SOTO CASTRUITA, Alejandro. *Daño a la integridad del ADN y la membrana del espermatozoide de conejo Nueva Zelanda blanco causados por sobrepeso*. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana, 2015.

SUAREZ PALOS, Del Rosario, G. M. *Evaluación de la actividad antioxidante de la chaya (cnidoscolus chayamansa) en un modelo experimental de diabetes en ratas wistar*. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, 2008.

UGARTONDO, V. *Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales*. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Universitat de Barcelona. Facultad de farmacia, 2009.

VASCONCELOS, Sandra Mary Lima, Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. *Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação*. Química Nova, São Paulo. Vol. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VENEREO GUTIÉRREZ, Justo R. *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Revista Cubana de medicina militar, 2002, vol. 31, no 2, p. 126-133.

VULCANO, Laura Andrea Denzoin, Soraci, A. L., & Tapia, M. O. *Homeostasis del glutatión*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 2013, vol. 47, no 3, p. 529-539.