

GUIA DE LABORATORIO

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Autora: Martha Lucia Ruiz Benitez

Programa académico: Química y Farmacia

Agosto 2020

Universidad Simón Bolívar



1. INTRODUCCIÓN

En el campo de química farmacológica una de las aplicaciones fundamentales es la determinación de las propiedades antioxidantes de cada órgano de las plantas como hojas, frutos, flores, raíces, entre otros, para determinar los beneficios de un producto vegetal en el ser humano y animal.

Los antioxidantes son considerados moléculas que ayudan a prevenir la oxidación de moléculas producidas por radicales libres que éstos a su vez son moléculas inestables que son generados de forma endógena mediante reacciones biológicas presentes en procesos metabólicos normales y de defensa. Los radicales libres también pueden ser adquiridos de forma exógena a través de la radiación como la luz ultravioleta (UV), humo del tabaco, contaminación ambiental, entre otros, cuyas causas desencadenan la oxidación de las biomoléculas presentes en nuestro organismo como lo son las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, conllevando a la generación de inflamación, envejecimiento y la aparición de enfermedades.

Los antioxidantes son muy importantes puesto que ellos evitan que los radicales libres genere reacciones en cadena que conlleven al daño celular, mediante la transferencia de electrones conllevando a estabilizar esos radicales libres, inhibiendo y evitando así las reacciones de oxidación; favoreciendo la prevención de diversas enfermedades como las circulatorias, cardiovasculares, neurológicas, cancerígenas, entre otras.

La diversidad botánica ofrece una amplia variedad de especies vegetales (frutas y verduras) que endógenamente cuenta con metabolitos que presentan propiedades antioxidantes, dentro de los cuales están el brócoli, té verde, vino tinto, zanahoria, cacao, perejil, berenjena, tomate, entre otros que cuentan con estas propiedades, siendo los flavonoides, polifenoles, carotenoides, como los betacarotenos, los licopenos, vitamina A, vitamina C, vitamina E los metabolitos que ayudan a prevenir el desarrollo a enfermedades. Así mismo, nuestro organismo tiene un sistema antioxidante dentro de los cuáles se encuentran: catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, coenzima Q10 y glutatión peroxidasa que ayuda a contrarrestar el exceso de radicales libres. Sin embargo, si hay un exceso de radicales libres y una poca cantidad de antioxidantes, se generará el estrés oxidativo, siendo una de las causas principales que conllevan al envejecimiento y a la patogénesis de diversas enfermedades.

2. OBJETIVOS

- ❖ Evaluar la actividad antioxidante de extractos totales
- ❖ Conocer el método de actividad antioxidante - DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)
- ❖ Conocer el método de actividad antioxidante vía atrapamiento de radicales cromóforos ABTS (Ácido 2,2'- azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6)



3. MATERIALES Y EQUIPOS

- ❖ Muestras de plantas y extractos
- ❖ Equipo de destilación
- ❖ Equipos de cromatografía
- ❖ Metanol
- ❖ Etanol
- ❖ Acetona
- ❖ Acetato de Etilo
- ❖ Éter de petróleo
- ❖ Diclorometano
- ❖ ABTS
- ❖ DPPH
- ❖ Ácido ascórbico (Vitamina C).
- ❖ Rotavapor
- ❖ Frascos de 50, 250 y 500 mL
- ❖ Pipetas volumétricas de 5 y 20 mL
- ❖ Plancha de calentamiento
- ❖ Cubetas en cuarzo
- ❖ Espectrofotómetro UV/VIS

4. PROCEDIMIENTO

Para llevar a cabo el análisis de actividad antioxidante de muestras vegetales, inicialmente se debe realizar la recolección del material vegetal, seguido de la obtención de extractos de diferente polaridad partiendo del material vegetal previamente identificado y finalmente la determinación de la actividad antioxidante mediante las pruebas DPPH y ABTS.

- **Recolección del material vegetal**

Se debe tener en cuenta la fecha y el lugar de la colecta, las coordenadas, las condiciones climáticas presentes en el día de la recolección, la estación del año, indicar qué órganos vegetales se recolectaron. Posterior a la colecta, se debe identificar la especie vegetal, si está registrada o es una especie nueva y finalmente realizar el secado del material obtenido ya sea a temperatura ambiente o en estufa climatizadas, dependiendo del órgano vegetal de interés.



- **Obtención de extractos**

Para la obtención del extracto del material vegetal recolectado y secado, se debe pasar por diversos métodos físicos (depende del órgano vegetal), en el caso de algunas hojas, semillas deben ser trituradas, seguido de la maceración. Otros extractos pueden ser obtenidos mediante maceración con ayuda de disolventes como el metanol o diclorometano y su posterior filtración; otros órganos vegetales como las hojas o flores con propiedades aromáticas deben ser procesadas mediante la destilación por arrastre de vapor y para la obtención de aceites esenciales de semillas, la extracción sólido-líquido es usada mediante soxhlet y posterior uso del rotavapor, siendo ésta una de las técnicas más utilizadas.

Por otra parte, el uso de las técnicas como la cromatografía y la espectrometría de masas contribuyen en la separación e identificación de metabolitos presentes en la muestra de interés.

- **Determinación de la actividad antioxidante**

MÉTODO DPPH

DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) propuesto por Blois en 1958, consiste en un método de captación de radicales libres muy usado para determinar la actividad antioxidante de frutas (zumos), verduras, café, entre otros. Su fundamento se basa en la aceptación de un electrón o átomo de hidrógeno por la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, que en solución en metanol es de color violeta intenso.

Este estudio requiere de un espectrofotómetro que mediante una longitud de onda de 517 nm es medida la absorbancia a medida que el electrón es aceptado, en la cual la solución DPPH al reaccionar con un sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta presente en la solución inicial se desvanece, pasando del color violeta a un color amarillo (reducción del radical libre por antioxidantes), siendo el amarillo un color indicador de las propiedades antioxidantes de las muestras analizadas de interés.

Para la realización de este método, inicialmente se debe preparar las soluciones patrón donde se disuelven 2 mg de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (marca SigmaAldrich), en 100 mL de metanol grado analítico, como patrón de referencia se utiliza una solución stock de quercetina a diferentes concentraciones: 100 µg/mL, 50 µg/ml y 25 µg/ml y para la realización de las mediciones en el espectrofotómetro se adiciona a la celda 1 ml de DPPH más 200 µL de cada uno de los extractos a evaluar de forma separada, con diferentes concentraciones a estudiar, dejando actuar entre 10 a 20 minutos y posteriormente se observa el cambio cualitativo de color.

Nota: la absorbancia inicial es registrada en el minuto cero sin el antioxidante de referencia y el registro de absorbancia se realiza después de adicionar el antioxidante de referencia cada 30 segundos durante 10 minutos.



Figura 1. Método DPPH (cambio de color después del contacto con antioxidantes)
Fuente de imagen: <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>

Como resultado se obtiene una curva de referencia y se indica el porcentaje de captación se calcula con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Captación DPPH} = \frac{A \text{ Inicial} - A \text{ final}}{A \text{ inicial}} \times 100$$

Donde, el porcentaje de captación representa la pérdida del color purpura a amarillo del radical DPPH*, cuando se agrega un compuesto antioxidante, disminuye así la absorbancia de la solución, que es medida a 517 nm.

MÉTODO ABTS

Método propuesto por Miller, N.J. et al en 1993. ABTS (Ácido 2,2'- azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6), (cation radical) presenta un intenso color verde-azul, radical generado químicamente mediante la interacción con persulfato potásico antes de la reacción con los antioxidantes (ver figura 2).

En la medición de los compuestos de interés con capacidad antioxidante, éstos reaccionan directamente con el cation radical, disminuyendo así la intensidad del color. El radical de este método posee solubilidad en medios polares y apolares, no es afectado por la fuerza iónica y debido a esto es capaz de evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos de extractos de plantas y de fluidos biológicos. Este ABTS es el más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, reduciendo posibilidades de interferencias de los compuestos coloreados.

En relación a la preparación de las soluciones patrón, se debe disolver 50 mg de (ABTS) 2,2-Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (marca Sigma-Aldrich), en 50 mL de agua desionizada, seguidamente se adiciona 2,45 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y esta reacción se deja reaccionar a una temperatura de 3°C durante 48 horas en la oscuridad. Como control se prepara ácido ascórbico: Con una solución stock de 250 mg/L de metanol disuelta en 25 mg de ácido ascórbico (Vitamina C), en 100 mL de metanol y posteriormente se realizan las diluciones de 250, 125, 62.5, 25, 12.5 y 6.25 miligramos de antioxidante por litro de metanol, con la finalidad de realizar la curva de referencia. Se usa 600 µL del radical ABTS más 200 µL de cada una de las diluciones a estudiar y las mediciones se realizan en el tiempo 0 y la absorbancia final a los 10 minutos después de agregar trolox.

el porcentaje de captación se calcula con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Captación de ABTS} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100$$

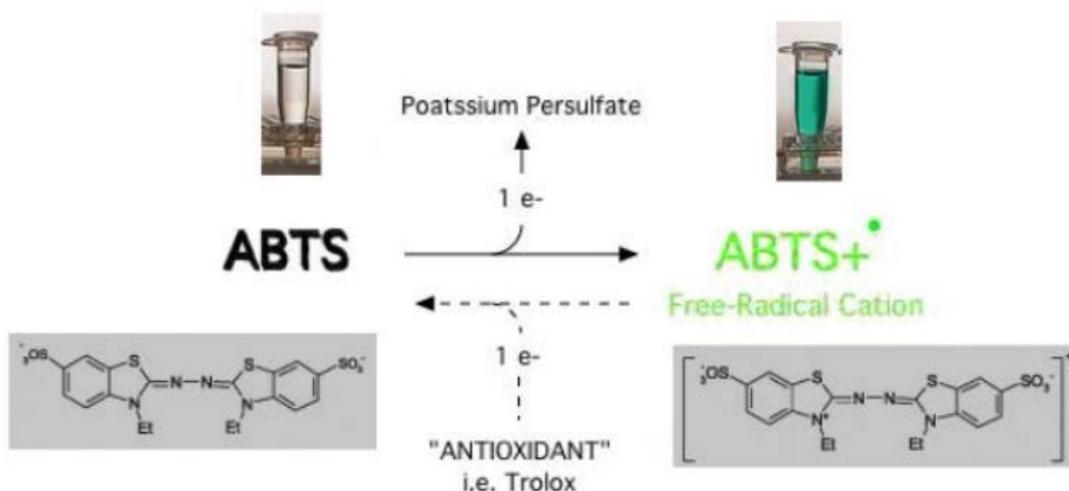


Figura 2. Principio del ensayo de capacidad antioxidante mediante ABTS (Boligon et al., 2014).

Fuente de imagen: Javier López do Campo Julio, 2017. Universidad da Coruña

https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19610/L%C3%B3pezdoCampo_Javier_TFG_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y



5. BIBLIOGRAFÍA

- Boligon, A., Machado, M. and Athayde, M. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, 4(7), pp.517-522.
- Coronado Marta et al., Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr Vol. 42, N°2, Junio 2015.*
- Deepak M. Kasote, Surendra S. Katyare et al., Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *Int. J. Biol. Sci. 2015, Vol. 11.*
- Gallego Iradi María Gabriela. Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles. Barcelona, 2016
- <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>
- López do Campo Javier. 2017. Estudio comparativo de la actividad antioxidante en fresas de cultivos de origen tradicional versus ecológico. Universidad da Coruña
- Ricardo Bohorquez Fajardo. Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd. 2016.
- Robles-García Miguel Angel. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). 2016.
- Sánchez Mendigaño Karen Johanna. Identificación de metabolitos secundarios en *critoniella acuminata* (kunth) r.m. king y h.rob. determinación de su actividad antioxidante y citotóxica. 2018.
- Wilson Leonardo Villarreal Romero. Análisis fitoquímico preliminar de *clethra fimbriata* kunth (clethraceae) a partir de extractos etanólicos de hojas y tallos. 2015



PRÁCTICA N° 6
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Pág. 7 de 7

Fecha vigencia:
Agosto 3/2020

PREGUNTAS

1. ¿Qué ventajas y desventajas presenta el ensayo DPPH en relación con los otros ensayos de determinación de antioxidantes?
2. Investigue qué plantas y frutas presentan mayor cantidad de antioxidantes
3. Explique en que consiste el estrés oxidativo