

Determinación de actividad antioxidante en alimentos funcionales

E.L. Dorantes-Salazar*¹, J.G. Báez-González¹, É. Gastelúm-Martínez³, J.L. Morales-Landa y E. García-Marquez²

1 Departamento de Ciencias de Alimentos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. **2** Departamento de Desarrollos de nuevos productos, Centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Subsele Noreste. **3** Departamento de Desarrollos de nuevos productos, Centro de investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Subsele sureste.

*lizabeth.dorantesslzl@uanl.edu.mx

RESUMEN

Los alimentos funcionales son aquellos a los que se les ha adicionado compuestos bioactivos con el objetivo de cumplir una función específica en el organismo. Entre la gran variedad de compuestos bioactivos que pueden ser adicionados se encuentran los compuestos antioxidantes, los cuales tienen la función de inhibir los radicales libres presentes en el organismo, responsables de causar daños en los lípidos de la membrana celular y en el DNA, que propicia diversas enfermedades crónicas degenerativas. Es por esto que resulta de vital importancia conocer las metodologías disponibles para la determinación de actividad antioxidante en alimentos funcionales. Gran parte de los métodos reportados en la literatura hacen uso de técnicas espectrofotométricas a través de mecanismos HAT y SET. Entre ellas se pueden destacar las metodologías de DPPH, ABTS, FRAP, TPC y TFC. No se suele hacer uso de metodologías oficiales debido a que no cuantifican en su totalidad los compuestos antioxidantes presentes, su complejidad o el gran volumen de reactivos empleado. Por lo tanto, la gran mayoría de publicaciones científicas hacen uso de metodologías publicadas en artículos científicos. Adicionalmente, los métodos se ven afectados por distintas sustancias presentes en la matriz, que causan interferencia e incertidumbre en los resultados.

Palabras clave: Radicales libres, antioxidantes y alimentos.

ABSTRACT

Functional foods are those to which bioactive compounds have been added in order to fulfill a specific function in the body. Among the great variety of bioactive compounds that can be added are antioxidant compounds, which have the function of inhibiting the free radicals present in the organism, responsible for causing damage to the lipids of the cell membrane and to the DNA, which promotes various chronic degenerative diseases. This is why it is vitally important to know the methodologies available for the determination of antioxidant activity in functional foods. Much of the methods reported in the literature make use of spectrophotometric techniques through HAT and SET mechanisms. Among them, the DPPH, ABTS, FRAP, TPC and TFC methodologies can be highlighted. Official methodologies are not usually used because they do not fully quantify the antioxidant compounds present, their complexity, or the large volume of reagents used. Therefore, the vast majority of scientific publications make use of methodologies published in scientific articles. Additionally, the methods are affected by different substances present in the matrix, which cause interference and uncertainty in the results.

Keywords: Free radicals, antioxidant & food.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son aquellos a los que les han sido añadido compuestos bioactivos, con el objetivo de cumplir una función específica dentro del organismo (Zain et al., 2022). Existe una amplia variedad de agentes bioactivos que pueden ser adicionados, entre los que se encuentran los compuestos antioxidantes.

Los antioxidantes son moléculas que tienen la función de inhibir o disminuir el proceso de oxidación de biomacromoléculas. Estos se pueden encontrar en pequeñas concentraciones dentro del cuerpo humano cumpliendo distintos roles fisiológicos. Entre ellos se puede destacar la capacidad para prevenir el estrés oxidativo, causado por un desbalance entre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su desintoxicación. Los radicales libres causan daños en los lípidos de la pared celular y en el DNA, propiciando la formación de muchos tipos de enfermedades crónicas degenerativas (Adwas et al., 2019).

Los antioxidantes pueden ser clasificados como endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos (también conocidos como enzimáticos) lo constituyen los compuestos producidos por el propio organismo como mecanismo de defensa. Mientras que, los antioxidantes exógenos (también conocidos como no enzimáticos) son aquellos obtenidos a través de la dieta. Estas moléculas inhibidoras de radicales libres pueden ser obtenidos de fuentes naturales como los polifenoles, las vitaminas y algunos minerales; o ser de carácter sintético, como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) (Flieger et al., 2021; Yadab et al., 2016), aunque estos últimos han sido usados para retardar el proceso de oxidación de lípidos y aceites comestibles. El objetivo de esta revisión es conocer las metodologías disponibles para la determinación de la actividad antioxidante en alimentos funcionales.

Actividad antioxidante

Gran parte de los métodos para la determinación de la actividad antioxidante hacen uso de técnicas espectrofotométricas a través de mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y de transferencia de un solo electrón (SET) (Sirivibulkovit et al., 2018). Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2006) determinaron que ciertos constituyentes no antioxidantes del alimento tales como los aminoácidos y ácidos urónicos pueden interferir con los polifenoles presentes en la matriz alimentaria, generando una capacidad antioxidante diferente al que obtendrían los polifenoles por sí solos, por lo que es necesario tenerlo en consideración para evitar la sobreestimación de antioxidantes.

En adición no existen metodologías oficiales para todos los métodos que se emplean para la determinación de la actividad antioxidante en alimentos funcionales (**Tabla I**). Mientras que aquellas que existen tienen un alto grado de complejidad y emplean un gran volumen de reactivos, como es el caso de la metodología de DPPH. Por otro lado, metodologías como TPC y TFC, de las que existen métodos oficiales, no pueden ser empleadas por sí solas para determinar la capacidad antioxidante de un alimento funcional, debido a que en su elaboración se emplea pulpa, jugo y/o fracciones de especies vegetales (**Tabla II**) que contienen una amplia variedad de compuestos antioxidantes. Por lo tanto, no determinarían en su totalidad todos los compuestos antioxidantes presentes. Debido a esto, la gran mayoría de publicaciones científicas hacen uso de metodologías publicadas en artículos científicos.

DPPH

El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es un método simple y uno de los más utilizados. El radical DPPH es reducido por un mecanismo de acción HAT, teniendo en su forma oxidada una coloración morada que cambia a un amarillo pálido en su forma reducida DPPH-H (Sirivibulkovit et al., 2018). La mayor parte de las metodologías se basan en la propuesta por Brand-Williams et al. (1995), la

cual utiliza 0.1 mL del antioxidante diluido en metanol y 3.9 mL de una solución de DPPH en metanol a 6×10^{-5} mol/L. La disminución de la absorbancia es medida por espectrofotometría en la región VIS, aproximadamente una longitud de onda de 515 a 520 nm. La solución de DPPH es preparada previo a su uso, comúnmente almacenada a bajas temperaturas y desechada el mismo día (Sirivibulkovit et al., 2018). Por su parte Ozgen, et al. (2006) determinaron que el DPPH puede proporcionar una mayor ventaja si los antioxidantes de interés son solubles en solventes orgánicos.

ABTS

La preformación del radical ABTS (2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) es obtenida por la oxidación del reactivo por persulfato de potasio y reducido con el mecanismo ET por un antioxidante. Presenta una coloración azul-verdoso en su forma oxidada y es incolora en su forma reducida (Apak et al., 2007). La absorbancia es determinada por espectrofotometría en la región VIS a 734 nm (Ozgen, et al., 2006). Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2006) determinaron que el método ABTS es uno de los métodos más afectados por interferencias del solvente empleado y los constituyentes del alimento analizado. Por su parte Ozgen et al. (2006) determinaron que el radical ABTS en buffer de acetatos a pH 4.5 se mantiene más estable en comparación con el buffer de fosfatos pH 7.4 estándar, pero, debe tenerse en consideración la coloración de antocianinas, puesto que puede causar sobreestimación del resultado de análisis.

FRAP

La metodología FRAP tiene su principio en la reducción del ion férrico a ferroso a través del mecanismo HAT en medio ácido (pH 3.6). Tras la reacción, la solución originalmente incolora toma coloración azul por la formación del tripiridiltriazina ferrosa. La absorbancia se determina a 593 nm. La solución de FRAP es preparada previo a su uso, almacenada a 37 °C y desechada al final del día. Es un ensayo barato y el reactivo empleado es sencillo de preparar, el procedimiento es rápido y reproducible (Benzie & Strain, 1996; Thaipong et al., 2006). Los autores Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2006) determinaron que el método FRAP y el DPPH son los métodos menos afectados por interferencias del solvente empleado y los constituyentes del alimento analizado, pero, debe cuidarse la concentración de sustancias coloridas para evitar datos sobreestimados.

Contenido total de fenoles (TPC)

La mayor parte de los métodos empleados para la determinación del contenido de fenoles comprenden métodos redox colorimétricos, basados en las propiedades reductoras de los grupos fenólicos. Uno de los métodos más comúnmente empleados es el método Folin-Ciocalteu el cual, es empleado para la determinación del contenido total de fenoles tanto en extractos de plantas como en alimentos. Tiene su principio en la reducción en medio alcalino de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico presentes en el reactivo. Entre las desventajas del uso de este método se encuentra la interferencia de sustancias como el ácido ascórbico, azúcares reductores, ácidos orgánicos, aminas aromáticas y hierro (II). Asimismo, la diversidad de los polifenoles dificulta la estimación del contenido total de fenoles en alimentos, lo que ocasiona que los métodos no sean específicos y que, detecten todos los grupos fenoles presentes dentro de la muestra, incluidos aquellos presentes en proteínas (Nacks & Shahidi, 2004; Pérez-Jiménez et al., 2010; Chen et al., 2015; Singleton & Rossi, 1965).

Contenido total de flavonoides (TFC)

El acomplejamiento de los compuestos fenólicos con Al(III) ha sido utilizado para el desarrollo de métodos espectrofotométricos para la determinación del contenido total de taninos y flavonoides. La determinación del contenido total de flavonoides se basa en la formación de un complejo coloreado de los flavonoides con AlCl₃ en medio ácido. La absorbancia se determina a una longitud de onda de 407 nm (Nacks & Shahidi, 2004).

Tabla I. Metodologías oficiales.

DPPH	AOAC Determination of Antioxidant Activity in Foods and Beverages by Reaction with 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative Study First Action 2012.04
TPC	AOAC Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. AOAC Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13
TFC	AOAC Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content.

Tabla II. Alimentos funcionales.

Alimento	Actividad antioxidante	Referencia
Yogurt enriquecido con fenoles de hoja de olivo.	DPPH	(Tavakoli et al., 2018)
Yogurt enriquecido con pulpa concentrada de fresa.	ABTS, DPPH	(Jaster et al., 2018).
Yogurt enriquecido con jugo de Euterpe oleracea.	DPPH	(Coïsson et al., 2005)

Pasta de trigo duro enriquecida con la fracción de descortezado de trigo	ABTS, TPC	(Fares et al., 2010).
Bebida de láctea enriquecida con proteína de suero hidrolizada.	ABTS	(Mann et al., 2015)
Pan al vapor enriquecido con fibra de limón.	TPC, DPPH	(Fu, Chang & Shiau)
Pan con polvo de jengibre.	TPC, DPPH	(Balestra et al., 2011)
Pan enriquecido con cascara de cebolla.	TFC, ABTS	(Świeca et al., 2013)
Pan enriquecido con cebolla deshidratada.	FRAP	(Gawlik et al., 2013)
Pan de trigo adicionado con flavonas tartarias de trigo sarraceno.	TPC, TFC, DPPH	(Gawlik et al., 2009)
Helado, yogurt y mantequilla adicionados con concentrado de zanahoria negra.	TPC, TFC, ABTS, FRAP	(Pandey et al., 2021)

CONCLUSIONES

Los antioxidantes tienen la función de inhibir los radicales libres que se encuentran en contacto con el organismo, responsables las paredes de la membrana celular y el DNA, y ocasionan efectos adversos a la salud. Es por esto que el desarrollo de alimentos funcionales que los incluya en su formulación, requiere de una adecuada determinación que resulta por demás importante. No se suele hacer uso de metodologías oficiales debido a que difícilmente pueden adaptarse debido a su complejidad o el gran volumen de reactivos empleado. La gran mayoría de publicaciones científicas hacen uso de metodologías publicadas en artículos científicos. Adicionalmente, los métodos carecen de sensibilidad, viéndose afectados por distintas sustancias presentes en la matriz alimentaria, que causan interferencia e

incertidumbre en los resultados. Esto ocasiona no solo una baja precisión, sino que también una estimación poco confiable de los resultados correspondientes a su actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Adwas, A.; Elsayed, A.; Azab, A. & Quwaydir, F. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6(1), 43–47. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>
- Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S.; Bektaşoğlu, B.; Berker, B. & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Balestra, F., Cocci, E., Pinnavaia, G. G., & Romani, S. (2011). Evaluation of antioxidant, rheological and sensorial properties of wheat flour dough and bread containing ginger powder. *LWT - Food Science and Technology*, 44(3), 700–705. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.017>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Coisson, J. D., Travaglia, F., Piana, G., Capasso, M., & Arlorio, M. (2005). Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. *Food Research International*, 38(8–9), 893–897. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.009>
- Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food chemistry*, 170, 10-15.
- Fares, C., Platani, C., Baiano, A., & Menga, V. (2010). Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry*, 119(3), 1023–1029. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.006>
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>
- Fu, J. T., Chang, Y. H., & Shiau, S. Y. (2015). Rheological, antioxidative and sensory properties of dough and Mantou (steamed bread) enriched with lemon fiber. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.034>
- Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Dziki, D., Baraniak, B., Tomiło, J., & Czyz, J. (2013). Quality and antioxidant properties of breads enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1621–1628. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.151>
- Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.009>
- Jaster, H., Arend, G. D., Rezzadori, K., Chaves, V. C., Reginatto, F. H., & Petrus, J. C. C. (2018). Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration. *Food Research International*, 104, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.006>
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, First action 2017.13. *Journal of AOAC International*, 101(5), 1466-1472.
- Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3235–3241. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>

- Matić, P., Sabljčić, M., & Jakobek, L. (2017). Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content. *Journal of AOAC International*, *100*(6), 1795-1803.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, *1054*(1-2), 95-111.
- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Scheerens, J. C., & Miller, A. R. (2006). Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(4), 1151–1157. <https://doi.org/10.1021/jf051960d>
- Pandey, P., Grover, K., Dhillon, T. S., Kaur, A., & Javed, M. (2021). Evaluation of polyphenols enriched dairy products developed by incorporating black carrot (*Daucus carota* L.) concentrate. *Heliyon*, *7*(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06880>
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, *39*(7), 791–800. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.003>
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition*, *64*(3), S112-S120.
- Plank, D. W., Szpylka, J., Sapirstein, H., Woollard, D., Zapf, C. M., Lee, V., ... & Collaborators: Begelman A Camire M DeRito C DeVries JW Dougherty MP Hanson M Liu R Marquard M Ser A Stringer M. (2012). Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study first action 2012.04. *Journal of AOAC International*, *95*(6), 1562-1569.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical sciences*, *34*(7), 795-800.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
- Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyz, J. (2013). The influence of protein-flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chemistry*, *141*(1), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.048>
- Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S. M., & Katouzian, I. (2018). Evaluation of Physicochemical and Antioxidant Properties of Yogurt Enriched by Olive Leaf Phenolics within Nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(35), 9231–9240. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02759>
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, *19*(6-7), 669-675.
- Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J. P., Srivatva, S., & Prabha, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body-A Review. *Res. Environ. Life Sci*, *9*(11), 1328-1331.
- Zain, M.; Shori, A. & Baba, A. (2022). Potential functional food ingredients in bread and their health benefits. In *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *12*(5), 6533–6542. AMG Transcend Association. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.65336542>