



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC
UTILIZANDO UN SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO.**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. WILLMANN ANTONIO JIMÉNEZ MORALES

TUTORA
DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente

Dr. José Pedraza Chaverri

Vocal

Dr. Martín Merino Ibarra

Vocal

Dra. Martha Patricia García Camacho

Vocal

Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

Secretario

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Lugar donde se desarrolló el proyecto de investigación:

Laboratorio 228 “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutora del proyecto de investigación:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

El trabajo fue presentado en el 53º Congreso Mexicano de Química y 37º Congreso Nacional de Educación Química del 2 al 5 de octubre del 2018 en la Ciudad de México, en la modalidad de cartel y exposición oral.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de maestría con número de becario 620290 y número de CVU 817915.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (Proyecto IT200718) y al Facultad de Química (Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, PAIP 5000-9029) por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad brindada para poder llevar a cabo la realización de mis estudios de maestría.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), por brindar el uso del equipo de HPLC para poder realizar la separación de compuestos presentes en extractos de vainilla.

A la Facultad de Química por abrirme sus puertas para seguir profundizando mi conocimiento.

A la Dra. María del Pilar Cañizares Macías por darme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo, muchas gracias por todos sus consejos durante el desarrollo del proyecto, sobre todo por su tiempo, paciencia y apoyo brindados incondicionalmente.

A mis compañeros del laboratorio 228, gracias por brindarme su amistad y hacer que el trabajo experimental fuera más agradable. Pero sobre todo gracias por los consejos y sugerencias para que el presente trabajo fuera desempeñado con una visión conjunta de observaciones muy atinadas.

Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	2
2. Marco Teórico.....	3
2.1. Automatización por métodos de Flujo	3
2.2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	4
2.3. Dispersión en sistemas FIA.....	4
2.4. Aplicaciones FIA.....	5
2.5.-Antioxidantes	6
2.6. Métodos para determinar la capacidad antioxidante.	7
2.7. Método ORAC.....	7
3. Objetivos.....	8
4. Metodología	9
4.1. Equipos.....	9
4.2. Reactivos y disoluciones.....	9
4.3 Softwares.....	10
4.4. Método ORAC por FIA	10
4.5. Estudios previos de condiciones de reacción, para el ensayo ORAC por FIA usando un estándar de ácido cafeico.....	11
4.5.1 Detección de señal analítica.....	11
4.5.2. Estabilidad del reactivo AAPH.....	11
4.5.3. Diseño de experimentos factoriales.	11
4.6. Características de la metodología.....	12
4.6.1 Determinación del intervalo lineal curva de calibración trolox.	12
4.6.2. Límite de detección y límite de cuantificación	12
4.6.3. Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de vainilla.	12
4.6.4. Recobro.....	13
4.6.5. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	13
4.7. Método ORAC en LOTE.....	13
4.8. Curva de calibración por HPLC en fase reversa.	13
4.9. Separación y cuantificación por HPLC de extractos de Vainilla.	14
5. Resultados y discusión	14
5.1. Método ORAC por FIA	14

5.1.1 Detección de señal analítica.....	14
5.1.2. Estabilidad del reactivo AAPH.....	15
5.1.3. Diseño de experimentos factoriales.	16
5.1.4. Características de la metodología.....	17
5.1.4.1. Determinación del intervalo lineal.	17
5.1.4.2. Recobro.....	18
5.1.4.3. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.....	19
5.2. Método ORAC en LOTE.....	20
5.2.1. Correlación FIA vs LOTE.....	21
5.3. Curvas de calibración por HPLC en fase reversa.....	22
5.4. Separación y cuantificación por HPLC, en extractos de Vainilla.	22
5.4.1. Capacidad antioxidante de 4 estándares presentes en el extracto de vainilla.	23
6. Conclusiones	23
7. Perspectivas	24
8. Referencias	24

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), para determinar la capacidad antioxidante de compuestos puros y extractos de vainilla, empleando el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). La configuración del sistema se llevó a cabo utilizando tuberías de teflón, las cuales transportaban los reactivos y/o muestras a un reactor separador de nitrógeno con división de membrana, empleando caudales configurados mediante una bomba peristáltica y finalmente registrando señales analíticas con un detector de fluorescencia.

Las señales obtenidas por FIA adoptan formas de pico, que representan al bolo de inyección presente en el sistema. Estos picos en algunas ocasiones se asemejan a una campana gaussiana, teniendo en los extremos a la zona más diluida del bolo y en la parte central la zona más concentrada. Una forma de cuantificar reacciones por sistemas FIA, es medir el incremento o disminución de estos picos en función de la concentración de diferentes muestras. El ensayo ORAC se fundamenta en la capacidad del reactivo 2,2'-azobis- (2-amidino-propano) (AAPH), para formar radicales peróxilo a partir de un azocompuesto a 37°C y reaccionar con una sonda fluorescente (usualmente fluoresceína), relacionando el grado de reacción con la pérdida de fluorescencia de la sonda, de esta manera si usamos un antioxidante para proteger la pérdida de la fluorescencia, podemos determinar su capacidad antioxidante asociada al grado de reacción. Debido a que en un sistema FIA no es necesario que las reacciones alcancen un equilibrio ni físico ni químico para llevar a cabo determinaciones analíticas, fue posible realizar la reacción del ensayo ORAC en la zona más diluida del bolo de inyección. De esta manera la señal obtenida (pico) al efectuar la reacción, se conformó por dos partes: una señal positiva que representa a la zona más concentrada del bolo de inyección que no reacciona, y una señal negativa la cual representan a la zona más diluida del bolo de inyección que sí ha reaccionado. El análisis del presente trabajo se enfocó en la señal negativa, debido a que en ésta zona es donde se logró efectuar la reacción y se cuantificó la capacidad antioxidante, teniendo en consideración que al inyectar un antioxidante al sistema, la parte negativa del pico disminuía a medida que se incrementaba la concentración del antioxidante usado.

La optimización del sistema FIA se realizó mediante un diseño de experimentos en los que se estudiaron la influencia del caudal, la temperatura, las concentraciones de los reactivos AAPH y fluoresceína, el volumen de inyección, así como la velocidad de muestreo y tiempo de integración del detector. Se construyeron curvas de calibración empleando estándares de trolox y se determinó la capacidad antioxidante en muestras de extractos de vainilla y estándares de polifenoles. Las correlaciones entre capacidades antioxidantes obtenidas por el método ORAC empleando un sistema FIA y sistema de detección en microplacas de 96 pozos, fueron superior al 99%. Se demostró que el análisis puede llevarse a cabo por FIA y correlacionarse directamente con una determinación de uso convencional.

El sistema FIA presentó ventajas entre las que se encuentran un incremento de 5 veces en la sensibilidad en comparación con el método en microplaca, la reducción de la manipulación de reactivos por parte del analista, y principalmente el acortamiento del tiempo de análisis de 90 min a 5 min. Una característica notable de la determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC-FIA, fue poder utilizar los factores de dispersión del sistema para cuantificar en una zona

diluida del bolo de inyección, permitiendo así medir la capacidad antioxidante de manera inmediata, sin la necesidad de utilizar un tiempo prolongado de reacción.

1. Introducción

Los métodos analíticos con enfoque clásico, donde cada muestra que se analiza es asignada a un contenedor donde se realizan los pasos de un ensayo deseado (lote), requieren un consumo de tiempo prolongado y son propensos a errores del analista, especialmente en la fase pre-analítica (preparación de muestra), causando interpretaciones incorrectas en la fase analítica (detección). Los errores en la fase pre-analítica son atribuidos, principalmente, al pipeteo de volúmenes pequeños (del orden de microlitros o menos), a procesos de extracción, procesos de preconcentración, etc.

Una de las soluciones más prometedoras para disminuir los errores en la fase pre-analítica, es la implementación de métodos automáticos basados en flujo. Existen trabajos que presentan varias características, tales como: simplicidad, versatilidad, bajo costo y reducción en consumo de muestras tanto en compuestos puros como en matrices complejas, pretratamiento de muestras en línea con la detección, etc. En 2018 Kurbanoglu y colaboradores publicaron una revisión de metodologías electroquímicas enfocadas a la detección de compuestos farmacéuticos y biológicamente importantes empleando sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) desde el año 2000 a 2018 (Kurbanoglu et al., 2018), en el cual se cumplen varias de las características antes mencionadas. Otro ejemplo es el trabajo publicado en 2018 por Jaccoulet, el cual nos presenta un método rápido (menos de 30 segundos) para reconocer y cuantificar anticuerpos por FIA (Jaccoulet et al., 2018).

FIA se basan en una combinación de tres principios: inyección de muestra, dispersión de la zona de muestra inyectada y sincronización reproducible de su movimiento desde el punto de inyección y hacia el detector. Por lo tanto, a diferencia de otros métodos de análisis instrumental, las reacciones químicas tienen lugar mientras el material de la muestra se está dispersando dentro del reactivo portador, es decir, mientras que el proceso de dispersión está formando el gradiente de concentración de la zona de la muestra. Por esta razón, la dispersión es el tema central de los sistemas FIA. Los procesos anteriores son estrictamente reproducibles en todos los ciclos de muestreo para todas las muestras inyectadas, por lo tanto, se reducen los errores y se mejora la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados.

Para determinaciones por espectrofotometría, fluorescencia o quimioluminiscencia, el analito se debe convertir en un compuesto medible por un detector determinado. Los requisitos previos para realizar tal ensayo son que durante el transporte a través del sistema FIA, la zona de muestra se mezcle con reactivos y se permita un tiempo suficiente para la producción de un compuesto en una cantidad detectable. Sin embargo, se debe enfatizar que ni la mezcla homogénea ni el logro del equilibrio químico ("estado estable") son condiciones limitantes para que un ensayo basado en inyección de flujo se realice con éxito (Kolev, 2008).

La señal transitoria observada típicamente por un detector, durante el paso de la zona de muestra dispersa tiene la forma de un pico; la altura, el ancho o el área de este pico están relacionados con la concentración del analito. El intervalo de tiempo entre la inyección de muestra y el pico máximo, que produce la señal analítica, es el tiempo de residencia durante el cual tiene lugar la reacción química. En ausencia de reacciones químicas cuando el detector responde lineal e instantáneamente a las especies inyectadas, no hay diferencia si se mide la altura del pico, el área o

el ancho del pico, ya que todas proporcionan información útil, aunque la concentración del material inyectado está relacionada con cada uno de estos parámetros de una manera diferente.

Una muestra en solución, contenida en un bucle de inyección antes de la inyección, es homogénea y tiene una concentración inicial original, si pudiera ser escaneada por un detector, daría una señal cuadrada cuya altura sería proporcional a la concentración de la muestra. Cuando se inyecta la zona de muestra, sigue el flujo de la solución portadora, formando una zona dispersa cuya forma depende de la geometría de la tubería y el caudal. Por lo tanto, la curva de respuesta tiene la forma de un pico que refleja un gradiente de concentración, dentro del cual ningún elemento del fluido tiene la misma concentración de material de muestra (Ruzicka, 2018). Sin embargo, es útil ver este gradiente de concentraciones como elementos individuales del fluido, ya que cada uno de ellos tiene una cierta concentración de material de muestra, y cada uno de estos elementos es una fuente potencial de lectura, para efectuar una reacción.

En los últimos años, los antioxidantes se han convertido en compuestos indispensables del mundo nutricional, a tal grado que en numerosas publicaciones son denominados desde “moléculas maravillosas” a “moléculas fisiológicas”, debido a que representan un papel importante en las vías metabólicas y protegen a las células en términos de su capacidad antioxidante contra daño celular oxidante como trastornos neurodegenerativos (Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, pérdida de memoria, depresión, etc.) y enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis, cardiopatía isquémicas, hipertrofia cardíaca e hipertensión) (Rajendran et al., 2014). En la industria de los alimentos y en el análisis de nuevos productos antioxidantes para alimentos, es necesario el análisis de capacidad antioxidante por más de un método analítico. Entre los más comunes se encuentra el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) que se fundamenta en la capacidad del reactivo 2,2'-azobis(2-metilpropionamidino)dihidroclorado (AAPH), para formar un radical peróxilo capaz de oxidar diversos compuestos.

Desde una perspectiva química y biológica, se sabe que las cadenas de carbonos insaturados que contienen las cadenas lipídicas pueden presentar abstracción de hidrógenos, dando como resultado un radical altamente reactivo que en presencia de oxígeno molecular forma un radical peróxilo lipídico. Los radicales peróxilo son los acarreadores de cadenas de reacción y pueden oxidar aún más el lípido, produciendo hidroperóxidos lipídicos (LOOH), que a su vez se descomponen en una amplia gama de compuestos como alcoholes, aldehídos, formiatos de alquilo, cetonas, hidrocarburos y radicales alcoxilos (LO^{*}). La reactividad de los radicales peróxilo lipídicos se controlan más fácilmente en presencia de antioxidantes, y es en este sentido que el ensayo ORAC se considera un ensayo altamente importante, debido a su mecanismo similar para formar radicales peróxilo, teniendo así una mejor aproximación de protección de capacidad antioxidante en sistemas lipídicos (aceites y membranas celulares) (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

2. Marco Teórico

2.1. Automatización por métodos de Flujo

Además de las características analíticas que generalmente se tienen en cuenta para evaluar un procedimiento analítico (por ejemplo, exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad), la cantidad y la toxicidad de los desechos son aspectos importantes que deben considerarse. La minimización del consumo de reactivos contribuye a reducir tanto los costos operativos como la toxicidad de los desechos, mientras que el volumen de efluentes define la cantidad de desechos a tratar y en consecuencia los costos relacionados. La tendencia de desarrollo de procedimientos más ecológicos

y la adopción de procedimientos respetuosos con el medio ambiente es obligatoria para el cumplimiento de los lineamientos ISO 14000 (Melchert et al., 2012).

La automatización de los ensayos basados en reactivos, transformó la tradicional "química de vaso de precipitados" de una tarea que consume mucho tiempo de trabajo, en una interfaz asistida por computadora que produce la información deseada en tiempo real. Las determinaciones analíticas de rutina se pueden automatizar de dos maneras, en el modo por **lotes** o en el modo de **flujo**. El procesamiento por lotes se basa en el enfoque clásico en el que a cada muestra que se analiza se le asigna un contenedor, dentro del cual se realizan los pasos de un ensayo deseado. La versión moderna de un vaso de precipitados es un micropocillo (normalmente usando microplacas de 96 pocillos), así que la medición manual de muestras, reactivos y otras manipulaciones mecánicas, se llevan a cabo mediante robótica en la automatización por lote (Ruiz-Capillas & Nollet, 2015). El procesamiento de flujo se caracteriza por sólo dos componentes mecánicos, una **bomba** y una **válvula**. Las muestras se procesan en línea en un conducto tubular cerrado, protegiéndose de un entorno exterior.

A lo largo de los años, los sistemas de flujo se redujeron de mililitro a escala micro e incluso nano litro. El modo de flujo es adecuado para automatizar muestras líquidas, ya que las operaciones de un ensayo están unidas por una corriente de flujo continuo. En la actualidad el análisis de flujo, se ha convertido en un tema de más de 20,000 artículos y más de 20 monografías, floreciendo en una variedad de técnicas tales como (Melchert et al., 2012): análisis por inyección en flujo (1975), análisis por inyección secuencial (1990), multi-conmutación por análisis en flujo (1994) y estrategia lab-on-valve (2000).

2.2. FIA

FIA es una metodología basada en flujos, que durante los últimos 40 años ha traído velocidad, manejo automatizado de soluciones, miniaturización y bajo costo para el laboratorio analítico. El FIA se basa en la inyección de muestras en una corriente portadora que fluye de manera unidireccional a la que se agregan los reactivos en puntos de confluencia. A medida que la zona inyectada se desplaza en dirección del flujo, la muestra se dispersa en el reactivo portador y comienza a formarse un producto entre la zona de muestra y el reactivo. De esta manera, un gradiente de concentración se forma por la dispersión de la zona de muestra, y una señal transitoria refleja el gradiente de la zona de muestra a medida que pasa a través de un detector. La lectura del detector es, por lo tanto, el resultado de dos procesos que tienen lugar simultáneamente: la dispersión de la muestra y las reacciones químicas resultantes (Ruzicka & Hansen, 1988).

2.3. Dispersión en sistemas FIA

Las condiciones de trabajo habituales de sistemas FIA ocasionan que el bolo de muestra inyectado no alcance el equilibrio químico ni físico, además de originar que éste se diluya (disperse) en la disolución portadora o en el reactivo. En los primeros trabajos publicados por White y sus colaboradores en 1975, Stewart 1976, y Ruzicka y su grupo en 1977 (Cañizares Macías, 2002), se demostró que para sistemas de flujo continuo el número de Reynolds es casi siempre inferior a 2000, por lo que se puede asegurar que existe un régimen de flujo laminar en el transporte de materia a través de las tuberías empleadas en los sistemas FIA. El régimen de flujo laminar produce una zona bien definida del bolo de muestra inyectado produciéndose un gradiente de concentración a lo largo de todo el bolo. En la figura 1 se presenta la dispersión común que sufre la muestra a lo largo de una configuración FIA; al ser un sistema continuo se obtiene una señal momentánea cuyo máximo corresponde a la parte del bolo menos diluida. Existen dos mecanismos que contribuyen a la dispersión del bolo de muestra inyectado:

a) Transporte por convección desarrollado en condiciones de flujo laminar, que origina un perfil parabólico donde la velocidad lineal de las moléculas en las paredes del tubo es igual a cero, mientras que las moléculas que se encuentran en el centro del tubo viajan al doble de la velocidad media.

b) Transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración (horizontales y/o verticales) en diferentes momentos del transporte por convección.

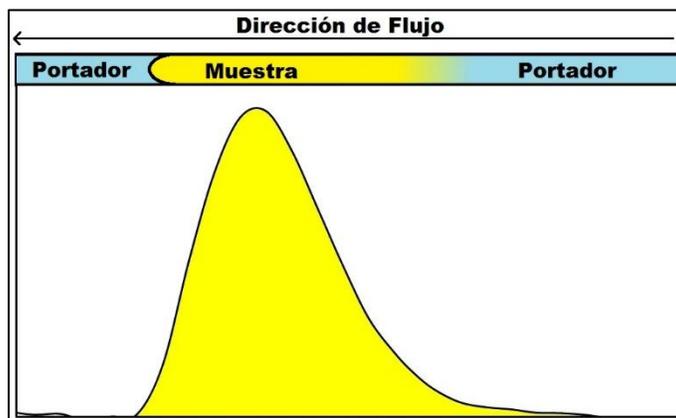


Figura 1.-Dispersión asimétrica de muestra.

Por lo tanto, la forma de una señal FIA (pico) dependerá del tiempo en el que el bolo de muestra se encuentra dentro del sistema. A tiempos demasiado cortos la dispersión es prácticamente cero y no se genera un gradiente de concentración en el bolo inyectado; por otra parte, tiempos de estancia largos ocasionan una dispersión muy notoria originando picos muy anchos. Debido a esto es necesario establecer cuál es el tiempo de residencia más adecuado. Generalmente, la señal óptima es aquella en el que el transporte por convección y por difusión influye de la misma manera, no predominando uno sobre el otro, aunque evidentemente esta decisión dependerá de la reacción que se va a llevar a cabo.

Las características del pico (tiempos de arranque, residencia y ancho de banda y altura o área del pico) dependen de las características hidrodinámicas del sistema FIA: caudal, volumen de inyección, longitud del reactor, etc., siendo difícil establecer un modelo teórico de la dispersión capaz de predecir el comportamiento de un bolo inyectado en una configuración FIA. Generalmente los sistemas FIA tienen más de un canal por lo que debe tenerse presente las confluencias (tamaño y geometría), la geometría de la celda de flujo, las conexiones, el volumen de inyección, etc.

Con este principio se puede establecer, de manera general, que la altura de la señal FIA depende principalmente del tiempo de residencia del bolo de muestra inyectado en el sistema. A mayor tiempo de residencia mayor dispersión, por lo que reactores largos o caudales bajos incrementan la dispersión. Por otra parte, volúmenes de inyección pequeños incrementan la dilución de la muestra disminuyendo la altura del pico FIA.

Cuando ocurre una reacción química, el considerar la dispersión como un fenómeno puramente físico como consecuencia de proceso de convección o difusión no es correcto. Los aspectos cinéticos deben ser considerados en FIA ya que la medición se realiza en condiciones de no-equilibrio.

2.4. Aplicaciones FIA

Los sistemas FIA se diseñaron inicialmente como herramientas para la automatización de ensayos de laboratorio. Desde la determinación de fosfatos por inyección en flujo en 1975, el análisis por inyección en flujo se ha aplicado a más de 2,000 analitos diferentes ya sean inorgánicos u orgánicos,

siendo utilizado para el monitoreo continuo de estos analitos, como mercurio y arsénico, los cuales se han convertido en un foco importante de la comunidad analítica mundial debido su naturaleza tóxica en el medio ambiente. También es importante destacar la aportación de sistemas FIA como una herramienta para la investigación en una variedad de campos, como por ejemplo: los ensayos clínicos, quienes son de vital importancia hoy en día, y dado que los principales fluidos biológicos analizados son sangre y orina, se han desarrollado métodos indicadores de compuestos (fármacos o biomoléculas) que se puede estimar a partir de estudios de ingestión / excreción (Kleszczewski & Kleszczewska, 2001; Wiesenhofer et al., 2017). Algunas otras las aplicaciones son en: alimentos, bebidas y agrícolas (plantas, vegetales, productos lácteos y productos cárnicos); biológicas (ensayos de ADN, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimáticos, análisis celular e inmunoensayos); farmacéuticas (investigación, producción y control de calidad de medicamentos); ambientales (análisis trazas de gases atmosféricos, aguas, sedimentos y suelos); e industriales y de análisis de proceso (Kolev, 2008). El monitoreo continuo a menudo se debe realizar en campo o en un entorno industrial durante un período de tiempo prolongado. Esta es la razón por la que los sistemas FIA ahora se establecen como un método de elección, ya que ofrecen robustez, portabilidad y bajo consumo de reactivos.

La química analítica es una ciencia aplicada y sus resultados impactan nuestra vida cotidiana al relacionarse con la calidad del agua, los alimentos, los medicamentos, el medio ambiente y muchos otros aspectos de nuestra vida. Por lo tanto, el desarrollo de métodos analíticos siempre será impulsado por las aplicaciones, y la utilidad de nuestra investigación no sólo debe juzgarse por su novedad, sino también por su capacidad para proporcionar una respuesta que no se puede obtener de ninguna otra manera.

Los métodos de análisis por inyección en flujo pueden ser una herramienta poderosa para superar algunas de estas dificultades y ofrecer una alternativa de costo relativamente bajo. De hecho, los pretratamientos de la muestra, como la digestión de la muestra, el uso de microondas, UV o los procesos asistidos por radiación con ultrasonido, se pueden llevar a cabo de manera eficiente en sistemas de flujo, utilizando una cantidad extremadamente limitada de reactivos y no suponiendo ningún peligro para el operador. Los procesos de separación de masa (difusión de gas, diálisis, intercambio iónico) también se pueden realizar de forma múltiple, lo que permite minimizar las interferencias y llevar a cabo procesos de preconcentración del analito. Con respecto a la medición instrumental, los métodos de flujo permiten el análisis de la química húmeda, incluida la derivación de analitos y la detección instrumental. Además, como los métodos cinéticos basados en el tiempo se pueden implementar fácilmente, se puede obtener información adicional de las mediciones instrumentales.

2.5. Antioxidantes

El beneficio de los antioxidantes en la salud en humanos se ha convertido en un tema importante que ha involucrado a muchos científicos en todo el mundo. En los últimos años, los antioxidantes se han convertido en compuestos indispensables del mundo nutricional, siendo importantes en términos de su capacidad para proteger contra el daño celular oxidativo que puede conducir a condiciones como la enfermedad de Alzheimer, el cáncer, las enfermedades del corazón y también vinculado con la inflamación crónica.

Los antioxidantes se definen como una sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo a una molécula blanco. Existen informes recientes que sugieren que varios antioxidantes endógenos y exógenos se utilizan para neutralizar los radicales libres y proteger al cuerpo mediante el mantenimiento de equilibrios redox.

Los antioxidantes que se encuentran en los alimentos son una categoría heterogénea de moléculas y su efectividad para inhibir la oxidación, depende de sus características químicas y ubicación física dentro de un alimento (proximidad a los fosfolípidos de la membrana, las interfaces de la emulsión o en la fase acuosa). La importancia de los antioxidantes radica en su desempeño en las vías metabólicas ya que protegen a las células de sufrir oxidaciones y formar especies reactivas que pueden interactuar con procesos bioquímicos, dando como resultado una descompensación en el equilibrio homeostático de los seres vivos, lo que nos lleva a plantear la implicación de este desequilibrio en patologías humanas como los trastornos neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares (Rajendran et al., 2014). Sin embargo, vale la pena profundizar el hecho de conocer hasta qué punto el consumo de antioxidantes beneficia a los seres vivos para prevenir estas enfermedades, es por ello que desarrollar e implementar metodologías que nos indiquen las capacidad de un antioxidante presente en productos de consumo cotidiano, nos ayudan a la investigación de la actividad de estos antioxidantes a diferentes concentraciones a favor o en contra de las enfermedades asociadas (Oroian & Escriche, 2015).

2.6. Métodos para determinar la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante se ha evaluado por numerosos métodos analíticos para diferentes muestras de alimentos y matrices biológicas de interés, sin embargo, estos generalmente son multifuncionales, por lo cual la capacidad y los mecanismos antioxidantes se afectan por varios factores como las condiciones de oxidación, la cinética y la composición del sistema, las propiedades de reparto de los antioxidantes entre diferentes fases y su interfase y el estado físico del sustrato. Dada la complejidad que conlleva tomar en cuenta todos estos factores utilizando un solo ensayo, es necesario que cada protocolo antioxidante se realice con varias condiciones de oxidación y con diferentes métodos de medición (Frankel & Finley, 2008).

Con base en las reacciones químicas involucradas, los principales ensayos de capacidad antioxidante pueden dividirse a groso modo en dos categorías:

- 1) Ensayos basados en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH). Este tipo de ensayos miden la reacción cinética competitiva y la cuantificación se deriva de las curvas cinéticas. Generalmente se componen de un generador sintético de radicales libres, una sonda molecular oxidable y un antioxidante.
- 2) Ensayos basados en la reacción de transferencia de electrones (TE). Involucran una reacción redox con el oxidante, el cual también actúa como indicador del punto final de la reacción.

Ambos tipos de ensayo (TAH y TE) están diseñados para medir la capacidad captadora de radicales (oxidante) de una muestra dada. Por lo anterior, resulta de importancia entender el mecanismo y cinética de la autooxidación y de su inhibición para tener una mayor comprensión de las metodologías aplicadas en este estudio (Rojas-López, 2010).

2.7. Método ORAC

El ensayo ORAC ha sido ampliamente aceptado como una herramienta estándar para medir la capacidad antioxidante en las industrias nutraceuticas, farmacéuticas y alimentarias. Este ensayo se basa en la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo de una sonda, donde los radicales peroxilo se generan por la descomposición térmica (37°C) del azocompuesto AAPH. En el ensayo ORAC original, el radical peroxilo derivado del AAPH, reaccionaba con una sonda fluorescente llamada B-ficoeritrina, para formar un producto no fluorescente, que se podía indirectamente cuantificar fácilmente mediante fluorescencia. La degradación de la sonda fluorescente disminuía en la mezcla de reacción cuando los antioxidantes reaccionaban con los radicales peroxilo derivados de AAPH. La capacidad antioxidante se determina así por una disminución en la velocidad y la cantidad del producto no fluorescente formado a lo largo del

tiempo. Prior y colaboradores en 2005 desarrollaron y validaron un ensayo de ORAC mejorado con fluoresceína como sonda fluorescente (Huang et al, 2005). Además, el ensayo ORAC se adaptó a un formato de lector de placas de 96 pocillos, facilitando el análisis simultáneo de un mayor número de muestras (Huang et al., 2002). A pesar de las mejoras realizadas por Prior y sus colaboradores, aún se identifican inconvenientes y limitaciones del ensayo ORAC, las cuales van dirigidas a errores de la manipulación del analista con las muestras cuando son introducidas en los micropozos (Mellado-Ortega et al, 2017). En la Figura 2 podemos observar la secuencia de reacción presentada por el ensayo ORAC.

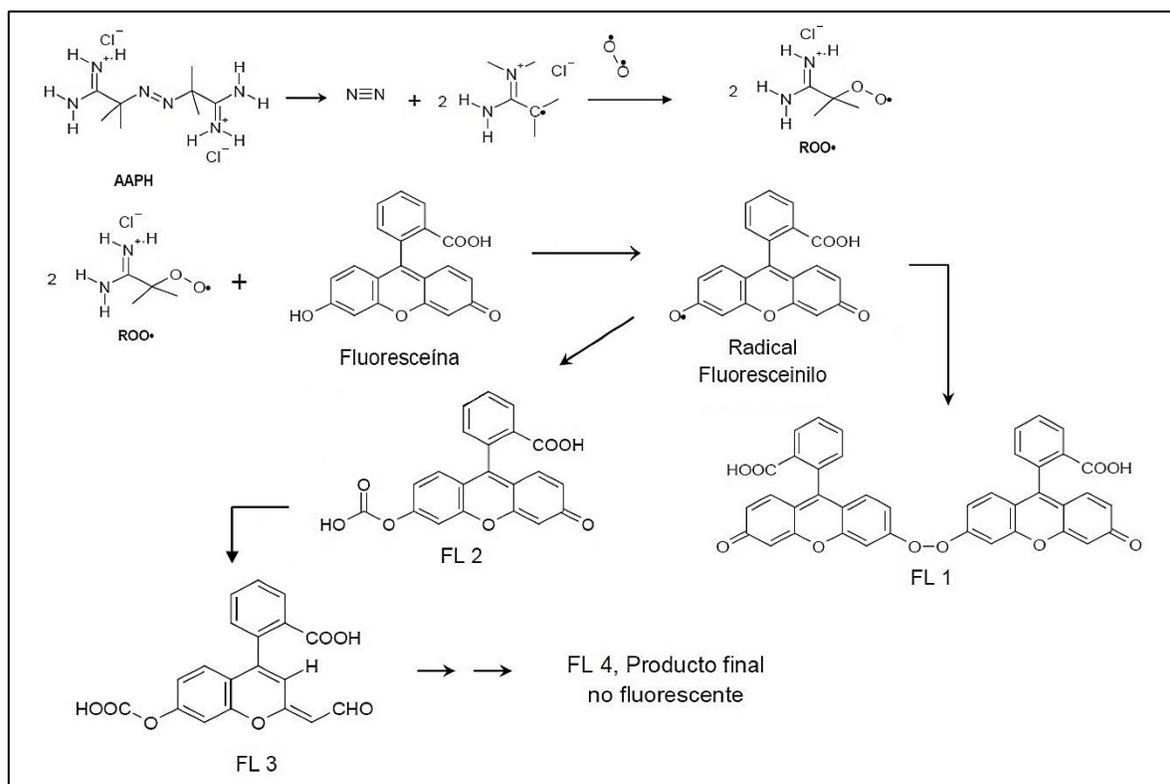


Figura 2. Secuencia de reacción del ensayo ORAC.

3. Objetivos

General:

Desarrollar un sistema FIA para determinar la capacidad antioxidante basado en el principio de dispersión de los reactivos usando el ensayo ORAC.

Específicos:

- Obtener una señal analítica capaz de cuantificar la capacidad antioxidante por el método ORAC-FIA de manera inmediata, usando los factores de dispersión del bolo de inyección.
- Optimizar las condiciones de reacción y los parámetros hidrodinámicos para la determinación de capacidad antioxidante por ORAC, utilizando diseños de experimentos factoriales.
- Construir diferentes curvas de calibración utilizando estándares de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox) y determinar sus parámetros estadísticos.

- Cuantificar la capacidad antioxidante de estándares de ácido cafeico, ácido tánico y ácido gálico, utilizando el método FIA propuesto y el método convencional (lote), y determinar su correlación.
- Obtener extractos de vainilla por microondas focalizado, utilizando vainas de vainilla curadas.
- Separar y cuantificar por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) los compuestos: vainillina, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, presentes en el extracto de vainilla.
- Evaluar la capacidad antioxidante por ORAC-FIA y ORAC-lote de vainillina, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico y extractos de vainilla, para relacionar la contribución antioxidante de cada compuesto en el extracto.

4. Metodología

4.1. Equipos

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC por FIA se utilizaron: un fluorímetro fotomultiplicador de tubo con detección en flujo (PMT-FL) Fialab, una celda de flujo Hellma (paso óptico de 10 mm), una bomba peristáltica de 4 canales Ismatec reglo ICC, tuberías tygon y teflón (DI 0.76 mm), una válvula de inyección Rheodyne de 6 vías, parrilla magnética Cimarec y una celda de extracción en flujo con filtro de membrana de polipropileno Whatman (tamaño de poro de 0.45 μm , 47 mm diámetro). Para obtener los extractos de vainilla se utilizó un horno de microondas de energía focalizada Maxidigest MX 350, también se emplearon un baño de ultrasonido Bransonic, una balanza analítica Ohaus (precisión ± 0.1 mg) y un potenciómetro Oakton. Para el ensayo ORAC por el método en lote se utilizó un detector de Microplaca Cytation 3 (Biotek) y se usaron microplacas de 96 pozos. Se requirió el uso de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) Agilent Technologies 1260 infinity acoplado con un detector de arreglo de diodos (DAD).

4.2. Reactivos y disoluciones

Los reactivos usados fueron grado analítico y se aforaron con agua destilada. Se usaron fluoresceína y AAPH para el método ORAC. También se utilizaron estándares analíticos de 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), ácido cafeico, ácido gálico, ácido tánico, ácido vanílico y vainillina (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri EUA).

La disolución amortiguadora de fosfatos (SAF, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.05 M, pH 7.0). Se almacenó en un frasco de vidrio a 4°C y se utilizó por un período no mayor a una semana verificando el pH. La disolución madre de fluoresceína para FIA fue 0.6 mmol/L y 0.3 mmol/L para lote. Se pesó la masa correspondiente para cada concentración y se disolvió con etanol absoluto caliente (10% del volumen total de aforo) y finalmente se aforó con SAF (0.05 M, pH 7.0). La disolución se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar para protegerla de la luz y se mantuvo en condiciones de refrigeración. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente tomando las alícuotas adecuadas y aforando con SAF a concentraciones de 300 nmol/L para FIA y 50 nmol/L para lote. La disolución de AAPH 0.11 M. Se preparó cada día de trabajo en SAF, con un tiempo máximo de uso de 2 hrs.

Los antioxidantes usados fueron: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido cafeico, ácido gálico, vainillina, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico, se prepararon tanto para FIA como para lote a concentraciones de 0.2 mmol/L,

pesando la masa correspondiente para cada concentración, disolviendo con etanol absoluto (10% del volumen total de aforo), y finalmente aforando con agua destilada. El ácido tánico se disolvió y se aforó con agua destilada. Las soluciones se almacenaron a 4°C durante 1 mes.

Las soluciones de trabajo de ácido cafeico, ácido tánico, ácido gálico, vainillina, ácido vanílico y ácido 4-hidroxi benzoico se prepararon diariamente disueltas en agua destilada a concentraciones en un intervalo de concentraciones de 1–12 $\mu\text{mol/L}$, excepto para el caso del 4-hidroxibenzaldehído que se preparó a concentraciones de 75-100 $\mu\text{mol/L}$. Las soluciones de Trolox se prepararon diariamente en agua destilada a concentraciones de 1-7 $\mu\text{mol/L}$, para la elaboración de la curva de calibración por FIA y de 10-50 $\mu\text{mol/L}$ por lote.

4.3 Softwares.

Se utilizó el programa FIALab for Windows 5.0 para el control de medición y registro de las intensidades fluorescentes. Para el tratamiento estadístico de los datos registrados se emplearon los programas STATGRAPHICS Centurion XVI.I y Microsoft Excel 2013.

4.4. Método ORAC por FIA

Con base en una metodología ORAC para determinar la capacidad antioxidante en extractos de vainilla propuesta por Rojas-López y Cañizares-Macías (2013), se propuso la adaptación de dicha metodología a un sistema FIA. En este estudio se implementó la configuración FIA presentada en la figura 3. Por medio de una bomba peristáltica y tuberías de teflón se impulsaron los reactivos (Fluoresceína y AAPH), la muestra (antioxidante o SAF) y una corriente de aire. Una solución de fluoresceína 300 nmol/L y el antioxidante (SAF para el blanco), se mezclaron en el punto de confluencia "A" (Figura 3) y se almacenaron en un bucle de inyección de 150 μL , ambos a un caudal de 0.30 mL/min. Una solución de AAPH 0.11 mol/L se utilizó como portador a un caudal de 0.25 mL/min y por medio de una válvula de inyección (Rheodyne), se inyectaron los 150 μL de la mezcla almacenada en el bucle de inyección.

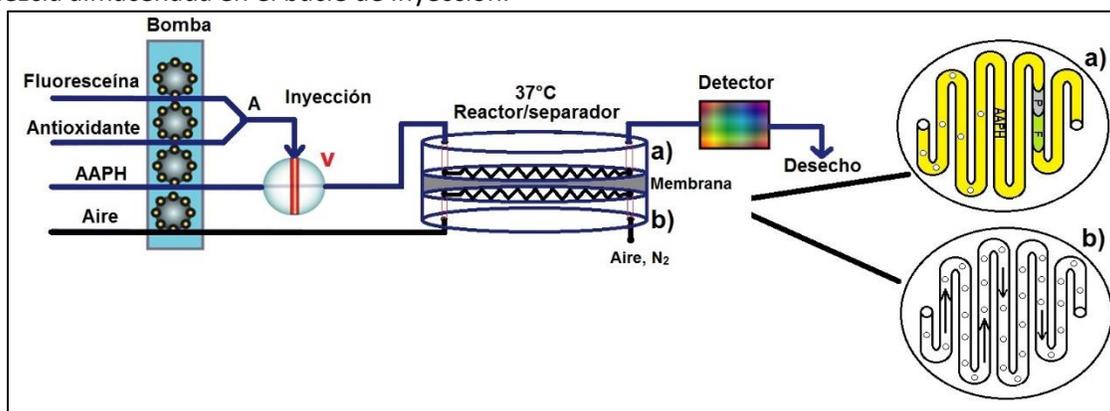


Figura 3.- Sistema FIA para determinar la capacidad antioxidante, empleando el ensayo ORAC. (A) Punto de confluencia, (V) Válvula de inyección, (a) Parte superior de la celda reactor/separador, (b) Parte inferior de la celda reactor/separador.

El uso de una celda de extracción fue primordial para el análisis, debido a que desempeñó dos funciones importantes: la primera fue llevar a cabo la reacción entre la solución portadora (AAPH) y el bolo de inyección (fluoresceína/antioxidante), por medio de un serpentín al interior de la celda; la segunda fue separar pequeñas microburbujas de nitrógeno gaseoso desprendidas por la solución AAPH al momento de formar el radical peróxilo. Para evitar la introducción de microburbujas a la configuración FIA, se utilizó una membrana de polietileno (no permeable a las soluciones empleadas), cuya función fue dividir la celda en dos partes (a y b de la Figura 3), en la parte superior (a) fue donde la solución portadora y el bolo de inyección reaccionaron, y dado que las

microburbujas fueron permeables a la membrana, fueron excluidas y acarreadas por una corriente de aire a un caudal de 0.25 mL/min que atravesó la parte inferior (b), para luego ser expulsadas del sistema. La celda de extracción se acondicionó a 37°C para que la reacción procediera y a la salida de dicha celda, el producto de reacción se transportó al detector de fluorescencia (PMT-FL FIALab configurado a 486 nm, λ excitación, y 500 nm, λ emisión).

La señal obtenida (pico) se formó por dos partes: una señal positiva y una negativa. La señal negativa fue la parte central del análisis, debido a que en esta zona es donde se pudo medir la capacidad antioxidante. Al introducir el antioxidante al sistema la parte negativa del pico va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración del antioxidante.

4.5. Estudios previos de condiciones de reacción, para el ensayo ORAC por FIA usando un estándar de ácido cafeico.

4.5.1 Detección de señal analítica.

Inicialmente se realizaron una serie de pruebas enfocadas a obtener una señal analítica del blanco de reacción entre la solución portadora de AAPH y un volumen de inyección de fluoresceína con SAF 0.05 mol/L (pH 7) previamente mezclados en el punto de confluencia de la Figura 3. Los parámetros que sirvieron de punto de partida, para obtener el blanco de reacción fueron: concentraciones de 0.11 y 0.22 mol/L de la solución de AAPH, y 300 y 600 nmol/L de fluoresceína; temperatura ambiente y 37°C para la celda de extracción (Figura 3) a un caudal de 0.5 mL/min de la solución portadora y un volumen de inyección de 100 μ L para la mezcla de fluoresceína y SAF. Obtenida la señal analítica del blanco de reacción, se utilizaron estándares de ácido cafeico a concentraciones de 5, 10 y 100 μ g/mL, para observar cambios en la señal analítica en función de su capacidad antioxidante.

4.5.2. Estabilidad del reactivo AAPH.

Con el fin de conocer la estabilidad del reactivo AAPH en función de su tiempo de preparación, se realizaron análisis utilizando la configuración FIA de la Figura 3 bajo el siguiente orden:

- a) Utilizando SAF como solución portadora se inyectaron 150 μ L de una mezcla de fluoresceína 0.08 μ g/mL y SAF, la señal obtenida se registró como la intensidad fluorescente de la fluoresceína antes de reaccionar con el reactivo AAPH.
- b) Empleando como portador al reactivo AAPH se inyectaron 150 μ L de una mezcla de fluoresceína 0.08 μ g/mL y SAF, para así obtener la intensidad de fluoresceína asociada a la reacción con el AAPH. La reacción se llevó a cabo a varios tiempos, desde la preparación de la solución AAPH (tiempo 0) con intervalos de 30 min hasta completar 5 horas, para así obtener 11 señales que nos pudiesen revelar el comportamiento del reactivo AAPH al ser utilizado en un periodo prolongado de tiempo.

4.5.3. Diseño de experimentos factoriales.

Después de obtener señales analíticas indicativas de que la reacción se llevaba a cabo y eran cuantificables en función del grado de reacción, se optimizaron los parámetros hidrodinámicos y las condiciones de reacción y detección. Con ayuda del software STATGRAPHICS Centurion XVI.I se realizaron dos diseños de experimentos factoriales a dos niveles, tomando como variable de respuesta la capacidad antioxidante máxima obtenida por área bajo la curva del ácido cafeico a concentraciones de 2 μ g/mL. Ambos diseños se describen en las Tablas 1 y 2. Se utilizó ácido cafeico debido a que el trolox es un reactivo muy caro.

Tabla 1.- Factores evaluados del diseño completo 2² con 1 punto central.

Factorial completo 2² con 1 punto central.			
Parámetros de detección			
Factores	Nivel bajo	Punto central	Nivel alto
Velocidad de escaneo (Hz)	1	4.5	8
Tiempo de integración (mS)	50	125	200
Total de experimentos	5		

Tabla 2.- Factores evaluados del diseño factorial fraccionado (¼) 2⁵ con 3 puntos centrales.

Parámetros hidrodinámicos y condiciones de reacción.			
Factores	Nivel bajo	Punto central	Nivel alto
Volumen de inyección (µL)	50	100	150
Temperatura de reactor (°C)	37	43.5	50
Caudal (mL/min)	0.25	0.5	0.75
Concentración de AAPH (mol/L)	0.11.	0.165	0.22.
Concentración de Fluoresceína (nmol/L)	300	600	900
Total de experimentos	11		

4.6. Características de la metodología.

4.6.1 Determinación del intervalo lineal curva de calibración trolox.

El intervalo lineal de la curva de calibración del estándar trolox usando concentraciones de 1-10µmol/L, se determinó a partir del promedio de 3 repeticiones en días distintos. La cuantificación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo midiendo el área bajo la curva de los picos obtenidos en fase negativa de la reacción y posteriormente transformados a porcentajes de protección, así bien, el área bajo la curva correspondiente al blanco de reacción entre la fluoresceína y el AAPH sin utilizar el estándar trolox nos indica que tenemos un 100% de reacción y 0% de protección, pero conforme se introduzca al sistema el estándar trolox con concentraciones en aumento, este porcentaje de reacción disminuye y el porcentaje de protección aumenta. De esta manera se construyó un gráfico promedio de porcentaje de protección (eje vertical y) vs concentración del estándar trolox (eje horizontal x).

4.6.2. Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron considerando el error de la regresión lineal ($S_{y/x}$), y la pendiente (b) de la curva de calibración. Para el caso del LD se multiplicó 3.3 veces $S_{y/x}$ y se dividió entre la pendiente, mientras que para el LC se multiplicó 10 veces $S_{y/x}$ y se dividió también entre la pendiente (García et al., 2002).

4.6.3. Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de vainilla.

Para demostrar la aplicación del método en antioxidantes se determinó la capacidad antioxidante en extractos de vainilla, así como en los principales compuestos de la vainilla: ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldehído y vainillina.

Basados en una metodología validada y optimizada reportada en la literatura (Longares-Patrón & Cañizares-Macías, 2006), se implementó el método de extracción por microondas focalizado (Maxidigest MX 350). Se pesó aproximadamente 1 g de vainas de *Vainilla planifolia* curadas, se colocaron dentro del tubo de digestión del equipo y se le agregaron 25 mL de etanol/agua al 70%. El equipo se programó de la siguiente manera: 20 ciclos formados por 1 minuto de irradiación con potencia al 50% (150 watts) y 3 minutos de no irradiación con un tiempo total de extracción de 80 minutos. Posterior a la extracción, se filtró y se recolectó el extracto. La extracción se realizó por triplicado con una mezcla de vainas de *Vanilla planifolifa* de la marca Vailiopap (vainilla y licores de Papantla).

4.6.4. Recobro

Para este análisis se propuso determinar la capacidad antioxidante de extractos de vainilla diluidos al 0.05% con agua destilada, y expresar la capacidad antioxidante en unidades de $\mu\text{mol/L}$ de equivalentes trolox, utilizando los datos de la curva de calibración promedio del estándar trolox. De la misma manera se midió por triplicado la capacidad antioxidante de una solución estándar de vainillina ($3 \mu\text{mol/L}$), expresando sus valores de capacidad antioxidante en $\mu\text{mol/L}$ de equivalentes trolox. Se utilizó el estándar de vainillina por ser el compuesto presente en mayor proporción en los extractos de vainilla. Después de conocer la capacidad antioxidante de los extractos de vainilla y de la solución estándar de vainillina, se adicionó la solución estándar de vainilla ($3 \mu\text{mol/L}$) en una proporción 1:1 (v/v) a los extractos de vainillina diluidos al 0.05%.

4.6.5. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

Se evaluó la precisión del método analítico en términos de reproducibilidad y repetibilidad dentro del laboratorio, para lo cual se prepararon por duplicado, durante siete días soluciones de vainillina $3 \mu\text{mol/L}$, ácido cafeico $1.5 \mu\text{mol/L}$ y un extracto de vainilla diluido 2000 veces, inyectando por triplicado cada muestra a las condiciones óptimas del sistema, y se midió su respuesta obteniendo un promedio de las tres inyecciones. Se determinó la capacidad antioxidante de cada muestra expresada en μmol equivalente trolox/mg de muestra pesada para el caso del extracto y en μmol equivalente trolox/ μmol de compuesto, para el caso de los compuestos puros. Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (Cofepris, 2014).

4.7. Método ORAC en lote

Para los análisis en lote se utilizó un detector de fluorescencia en microplaca Cytation 3 Biotek bajo una temperatura programada de 37°C . Se utilizaron soluciones de Trolox (como antioxidante de referencia) preparadas diariamente en agua destilada a concentraciones de $10\text{-}50 \mu\text{mol/L}$, para la elaboración de la curva de calibración. Se preparó una solución madre de Fluoresceína (0.3 mmol/L) disuelta en SAF 0.075 mol/L pH 7, posteriormente se trabajó a una concentración de 50 nmol/L . Finalmente, se preparó una solución de AAPH 0.153 mol/L en SAF para cada análisis. Cada pozo de la microplaca se llenó con $25 \mu\text{L}$ de antioxidante, $25 \mu\text{L}$ de AAPH, $150 \mu\text{L}$ de fluoresceína, y finalmente colocado en el equipo de detección por un tiempo de 90 minutos.

4.8. Curva de calibración por HPLC en fase reversa.

Con base a las condiciones reportadas en el material bibliográfico (Sinha et al., 2007), se llevó a cabo una separación cromatográfica por HPLC en fase reversa de 9 compuestos, empleando estándares analíticos y configurando un gradiente de elución presentado en la tabla 3. Posterior a la separación se procedió a construir curvas de calibración de estándar externo para 4 compuestos mayoritarios

presentes en la vainilla (ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldehído y vainillina) utilizando concentraciones de 1, 3, 5, 10, 30 y 50 µg/mL. Se utilizó una columna monolítica Chromolith RP-18e 100-4.6 mm d.i. a 280 nm, 25°C, flujo de 1 mL/min y volumen de inyección de 10 µL de mezcla.

Tabla 3.-Gradiente de elución para separar una mezcla de 9 compuestos.

Tiempo (min)	% de disolvente	
	Agua/ Ácido acético (pH=2.88)	Metanol
0	87	13
7	87	13
16	60	40
18	60	40
19	87	13

Agua/Ácido acético (99.8:0.2 v/v)

4.9. Separación y cuantificación por HPLC de extractos de vainilla.

Los extractos de vainilla se analizaron por HPLC-fase reversa, utilizando la configuración de gradiente de elución antes mencionado y cuantificando la concentración de los 4 estándares presentes en la vainilla. Después de cuantificar las concentraciones de cada compuesto, se relacionaron con sus capacidades antioxidantes analizadas por separado utilizando estándares (compuestos puros).

5. Resultados y discusión

5.1. Método ORAC por FIA

5.1.1 Detección de señal analítica

En la Figura 4 se presenta las señales analíticas obtenidas por la metodología FIA propuesta. Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó la parte negativa de la señal (Figura 4B), debido a la dispersión de la fluoresceína (parte superior de la Figura 4), es en la zona de la cola del bolo inyectado donde el AAPH reacciona con la zona más diluida de fluoresceína, por tanto al usar un antioxidante, este puede retardar la oxidación de la fluoresceína dependiendo de la capacidad antioxidante que tenga. Mientras menos sea la bajada de esta zona del pico, mayor capacidad antioxidante presentará la muestra utilizada (Figura 5).

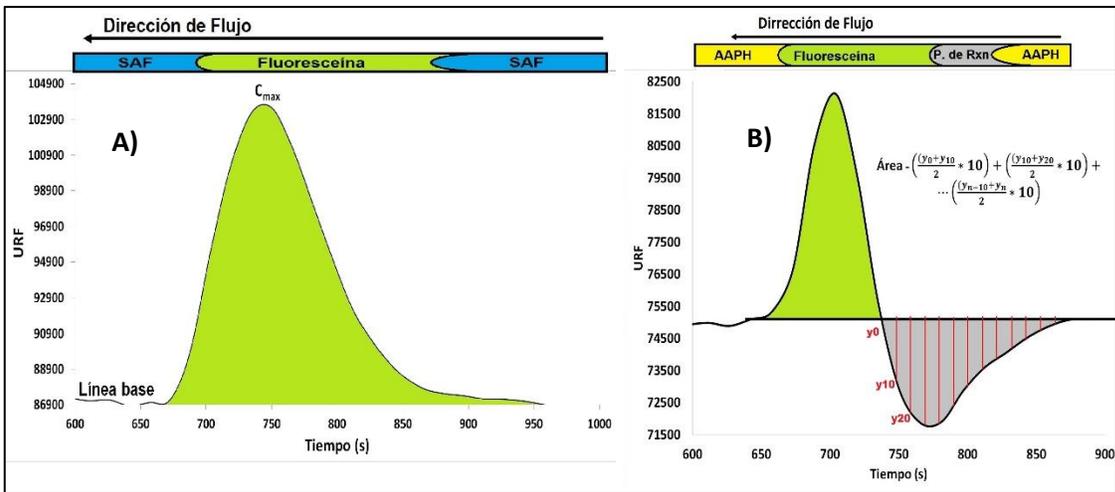


Figura 4.- A) Señal de fluoresceína sin reacción por FIA, B) Señal de fluoresceína en reacción con AAPH por FIA.

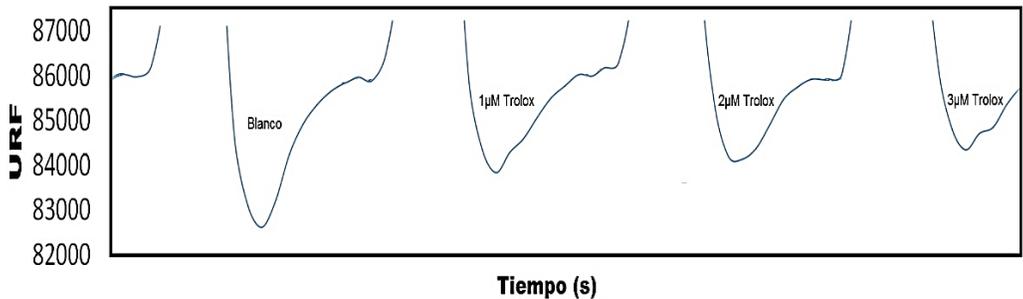


Figura 5.- Protección antioxidante de trolox, usando un sistema FIA por el método ORAC.

El transporte por difusión debido a la formación de gradientes de concentración nos permite cuantificar la reacción en la zona más diluida del bolo de inyección, sin la necesidad de requerir un decaimiento total de la señal analítica, reduciendo el tiempo de análisis a 5 min. Para cuantificar la capacidad antioxidante fue necesario medir el área bajo la curva de los picos (por el método de los trapecios) (Rojas-López y Cañizares-Macías 2013) en fase negativa y transformarlos a % de protección, así bien, el área bajo la curva correspondiente al blanco de reacción entre la fluoresceína y el AAPH sin utilizar un antioxidante, nos indica que tenemos un 100% de reacción y 0% de protección, pero conforme se introduzca un antioxidante a determinada concentración, este porcentaje de reacción irá disminuyendo y el porcentaje de protección irá en aumento. Para el cálculo de las áreas se utilizó el método de trapecios formados por dos valores de la función en los extremos del subintervalo ($\Delta x=10$ seg).

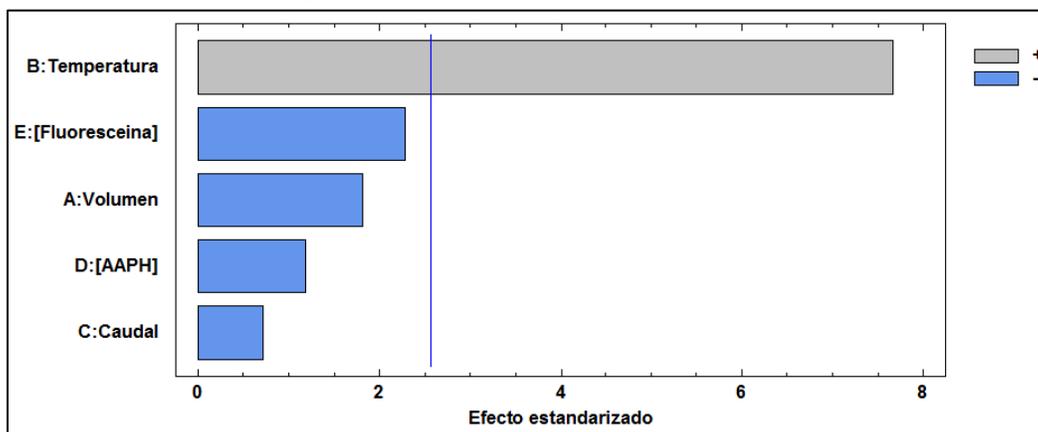
5.1.2. Estabilidad del reactivo AAPH.

En este estudio se demostró la baja estabilidad del reactivo de AAPH a tiempos prolongados de uso. Realizando una prueba estadística t con un valor crítico de 2.78 a un intervalo de confianza del 95%, se determinó que a los primeros 90 min de haber preparado la solución AAPH, los resultados del blanco de reacción entre la fluoresceína y el AAPH son estadísticamente similares, y aplicando otra prueba estadística t , pero ahora con el criterio de encontrar diferencias entre los resultados del

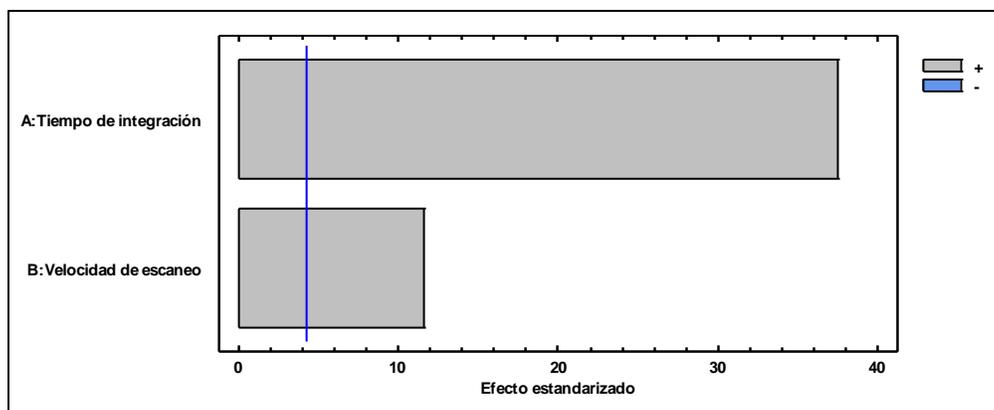
blanco de reacción de fluoresceína y el AAPH y un blanco sin reacción de sólo fluoresceína, se determinó que a partir de los 240 min los resultados del blanco de reacción y el blanco sin reacción eran estadísticamente similares con un valor crítico de 2.78 y un intervalo de confianza de 95%, por lo que se puede asegurar que a 240 min de su preparación el reactivo AAPH deja de reaccionar con la fluoresceína.

5.1.3. Diseño de experimentos factoriales.

Los diseños de experimentos se realizaron con la finalidad de determinar qué factores de los seleccionados son estadísticamente significativos al momento de realizar el análisis y cuantificar la capacidad antioxidante, buscando así la optimización de la metodología al considerar todas las posibles combinaciones entre los factores en cuestión. Por medio del *software STATGRAPHICS* se realizó el tratamiento de los datos a través de un ANOVA teniendo como objetivo maximizar la respuesta analítica (capacidad antioxidante). Posteriormente con el diagrama de Pareto estandarizado, se determinó, con un nivel de significancia de 95%, qué factores influyen de manera positiva o negativa sobre la respuesta. Aquellos factores que no afectan significativamente la cuantificación de la capacidad antioxidante se localizan por debajo a la línea perpendicular a las barras, mientras los que sobrepasan dicho límite, son considerados estadísticamente significativos. Para el caso de parámetros hidrodinámicos y condiciones de reacción presentados en la Gráfica 1, el factor estadísticamente significativo fue la temperatura. En el caso de los parámetros de detección, presentados en la Gráfica 2, se encontraron influencias significativas en ambos factores evaluados. Es importante mencionar que las interacciones entre los factores estudiados no resultaron estadísticamente significativas para ambos diseños.



Gráfica 1. Diagrama de Pareto estandarizado, usando la capacidad antioxidante como variable de respuesta. Diseño de experimentos factorial fraccionado $(\frac{1}{4})2^5$, para la optimización.



Gráfica 2. Diagrama de Pareto estandarizado empleando intensidad de la señal como variable de respuesta. Diseño de experimentos completo 2^2 , para la optimización.

Las condiciones óptimas para la metodología ORAC por FIA se calcularon a partir dos diseños de experimentos: un factorial fraccionado ($1/4$) 2^5 con tres puntos centrales y un factorial completo 2^2 , con ayuda del software Statgraphics. Los valores óptimos para cada factor evaluado se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4.-Valores óptimos para determinar capacidad antioxidante por el método FIA.

Factores evaluados	Valor óptimo
Parámetros hidrodinámicos y condiciones de reacción	
Volumen de inyección	150 μ L
Temperatura de reactor	37°C
Caudal	0.25 mL/min
Concentración de AAPH	0.11 mol/L.
Concentración de Fluoresceína	300 nmol/L.
Parámetros de detección	
Velocidad de escaneo	1 Hz
Tiempo de integración	200 mS

5.1.4. Características de la metodología.

5.1.4.1. Determinación del intervalo lineal.

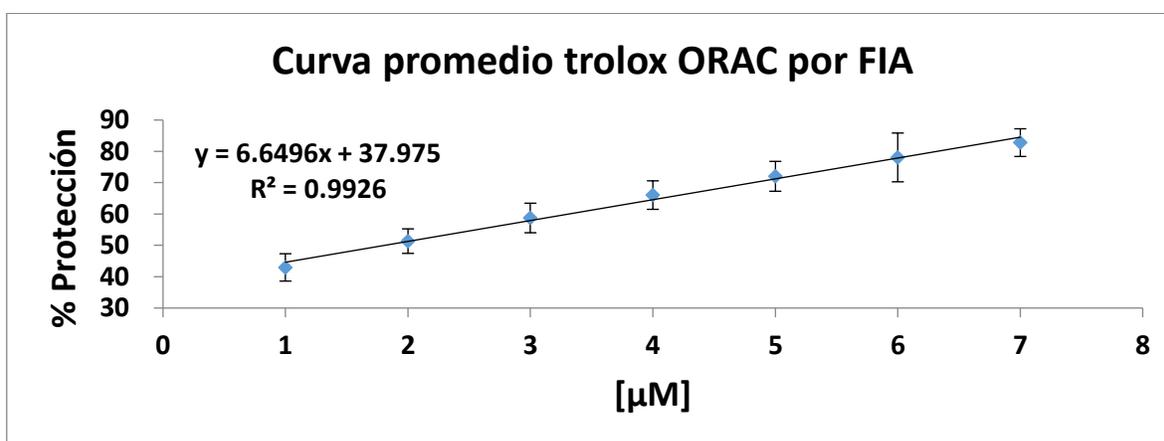
Los estándares de trolox con concentraciones por debajo de 1 μ mol/L y por encima de 7 μ mol/L, no dieron respuestas con tendencia lineal, por lo que para la determinación del intervalo lineal se consideraron las respuestas obtenidas en un intervalo de concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 μ mol/L, presentando un coeficiente de correlación > 0.98 .

Para obtener un mejor estimado de la curva de calibración entre un día y otro, se decidió construir una curva diariamente durante 3 días y se realizó la comparación de los parámetros estadísticos de las rectas de regresión obtenidas, los cuales se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros estadísticos para cada una de las curvas de calibración de trolox preparadas durante 3 días.

No. Curva	Ordenada al origen	Error	Pendiente ($\mu\text{mol/L}$) ⁻¹	Error ($\mu\text{mol/L}$) ⁻¹	Coefficiente de correlación
1	41.8857	1.3516	6.4532	0.3022	0.9946
2	37.9443	1.8626	7.2464	0.4165	0.9918
3	34.0986	1.5992	6.2479	0.3576	0.9919

Con el programa *STATGRAPHICS Centurion XVI.1* y empleando los datos de las 3 curvas de calibración, se construyó una curva promedio (Gráfica 3), la cual se utilizó en la cuantificación de la capacidad antioxidante de las diferentes muestras. La ecuación promedio de la recta fue: $y = 6.6496 (+/- 0.2568)x + 37.9743 (+/- 1.1483)$, con límite superior e inferior de 7.3097 y 5.9896 para la pendiente, y 40.9262 y 35.0224 para el intercepto. Obteniendo un LD de **0.53 $\mu\text{mol/L}$** y un LC de **1.61 $\mu\text{mol/L}$** .



Gráfica 3. Curva de calibración promedio para el método ORAC por FIA, utilizando el estándar trolox a diferentes concentraciones.

5.1.4.2. Recobro

Después de determinar la capacidad antioxidante de los extractos de vainilla y de una solución estándar de vainillina (3 $\mu\text{mol/L}$), se adicionó dicha solución estándar en una proporción 1:1 (v/v) a los extractos de vainilla diluidos al 0.05%, para así poder obtener porcentajes de recobros de la capacidad antioxidante adicionada por el estándar de vainillina.

Los porcentajes de recobro obtenidos para cada extracto son presentados en la Tabla 6 y se encuentran dentro del rango permitido con base en la referencia consultada (Cofepris, 2014), lo que nos indica que la metodología presenta un sesgo aceptable para muestras complejas como lo son los extractos de vainilla.

Tabla 6. Porcentajes de recobro, empleando extractos de vainilla con adiciones de vainillina.

	Extracto ($\mu\text{mol/L}$ trolox)	Vainillina ($\mu\text{mol/L}$ trolox)	Extracto más adición ($\mu\text{mol/L}$ trolox)	Cantidad recuperada de vainillina ($\mu\text{mol/L}$ trolox).	% de recobro	%Referencia*
Ext1	3.30 +/- 0.13	3.23 +/- 0.11	6.68 +/- 0.26	3.37 +/- 0.30	104.36 +/- 9.95	85-110
Ext2	2.82 +/- 0.47	3.23 +/- 0.11	5.77 +/- 0.05	2.95 +/- 0.47	91.39 +/- 14.89	85-110
Ext3	3.14 +/- 0.40	3.23 +/- 0.11	6.41 +/- 0.21	3.27 +/- 0.45	101.20 +/- 14.35	85-110

*COFEPRIS, 2014

5.1.4.3. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

Los resultados de la precisión, expresados en equivalentes trolox, del método propuesto, se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados para la medición de la precisión de la cuantificación de capacidad antioxidante en tres muestras.

Día	Extracto ($\mu\text{mol ET/mg}$ vaina)			Vainillina ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$ Vainillina)			Ác. Cafeico ($\mu\text{mol ET}/\mu\text{mol}$ Ác. Cafeico)		
	Réplica 1	Réplica2	Promedio	Réplica 1	Réplica2	Promedio	Réplica 1	Réplica2	Promedio
1	0.13	0.13	0.13	1.12	1.09	1.10	2.14	2.20	2.17
2	0.14	0.13	0.14	1.09	1.15	1.12	2.07	2.08	2.08
3	0.14	0.13	0.14	1.07	1.07	1.07	2.29	2.31	2.30
4	0.13	0.14	0.13	1.07	1.10	1.09	2.14	2.15	2.14
5	0.13	0.13	0.13	1.02	1.05	1.03	2.10	2.19	2.14
6	0.13	0.13	0.13	1.11	1.00	1.06	2.25	2.24	2.25
7	0.13	0.13	0.13	1.07	1.07	1.07	2.19	2.29	2.24
Promedio total			0.13			1.08			2.19

ET: Equivalente Trolox

Utilizando un análisis de varianza (ANOVA) se obtuvieron la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (GL) y el cuadrado medio (CM) de la variación de las capacidades antioxidante de cada muestra entre días y dentro de días (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio del método ORAC-FIA.

Extracto	SC	GL	CM
Entre días	8.57E-05	6	1.43E-05
Dentro de días	1.50E-04	7	2.14E-05
Total	2.36E-04	13	
Vainillina	SC	GL	CM
Entre días	1.01E-02	6	1.68E-03
Dentro de días	9.20E-03	7	1.31E-03
Total	1.93E-02	13	
Ácido Cafeico	SC	GL	CM
Entre días	7.06E-02	6	1.18E-02
Dentro de días	1.12E-02	7	1.60E-03
Total	8.18E-02	13	

Para poder calcular la repetibilidad obtenida en un mismo día (dentro de días) y la reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia en varios días (entre días), se utilizaron los parámetros estadísticos descritos en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros involucrados en la determinación de repetibilidad y precisión intermedia.

Parámetro estadístico	Fórmula
Desviación estándar de la repetibilidad (S_r)	$S_r = \sqrt{CM_{dentro\ de\ días}}$
Desviación estándar relativa de la repetibilidad (RSD_r)	$RSD_r = \frac{S_r}{promedio\ total} * 100$
Desviación estándar de la precisión intermedia (S_{PI})	$S_i = \sqrt{\frac{CM_{entre\ días} - CM_{dentro\ de\ días}}{n\úm\ replicas}}$ $S_{PI} = \sqrt{S_r^2 + S_i^2}$
Desviación estándar relativa de la precisión intermedia (RSD_{PI})	$RSD_{PI} = \frac{S_{PI}}{promedio\ total} * 100$

Los porcentajes obtenidos en ambos casos para cada muestra se presentan en la Tabla 10 y son menores al 4.0%. Con base en la referencia consultada (Cofepris, 2014), el criterio de aceptación de la repetibilidad y precisión intermedia se modifica en función de la concentración de la muestra que se analiza, es decir, si es una muestra pura o se han realizado diluciones. En este caso se trabajó con un extracto a un 0.05% de concentración, un estándar de ácido cafeico 1.5 $\mu\text{mol/L}$ (0.27 $\mu\text{g/mL}$) y una muestra pura de vainillina 3 $\mu\text{mol/L}$ (0.45 $\mu\text{g/mL}$), por lo que la reproducibilidad intralaboratorio y repetibilidad obtenidas para la metodología son excelentes, teniendo muy poca variación y alta precisión principalmente para el caso del estándar y la muestra pura.

Tabla 10. Valores de repetibilidad y reproducibilidad intermedia para cada muestra.

Muestra	Repetibilidad (RSD_r)	Reproducibilidad (RSD_{PI})	PRSD _r
Extracto (0.05%)	3.51%	3.21%	4%
Vainillina 3 $\mu\text{mol/L}$ (0.45 $\mu\text{g/mL}$)	3.36%	3.59%	8%
Ácido cafeico 1.5 $\mu\text{mol/L}$ (0.27 $\mu\text{g/mL}$)	1.82%	3.73%	8%

PRSD_r= valor previsto para la desviación estándar relativa de la repetibilidad y precisión intermedia.

5.2. Método ORAC en LOTE

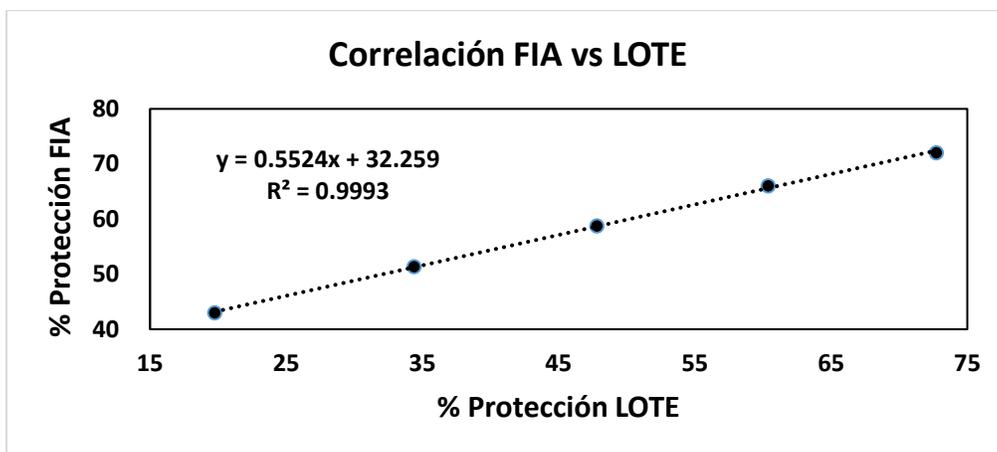
El intervalo lineal encontrado fue de 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{mol/L}$, los parámetros de la curva de calibración se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros de curva de calibración en lote con intervalo de confianza al 95 % para la cuantificación de capacidad antioxidante.

Parámetro	Valor estimado	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	
			Límite bajo	Límite alto
Ordena al origen	7.4335	0.7273	5.7563	9.1107
Pendiente	1.3194	0.0219	1.2688	1.3700
Coefficiente de correlación	0.9988			
LD ($\mu\text{mol/L}$)	2.14			
LC ($\mu\text{mol/L}$)	6.48			

5.2.1. Correlación FIA vs LOTE

Los porcentajes de protección de capacidad antioxidante obtenidos por FIA y lote usando soluciones estándares de trolox, se graficaron (Gráfica 4), para poder obtener un gráfico de correlación. Dicha correlación fue superior al 99%, corroborando que existe una correlación directa de las respuestas por ambos métodos al realizar el ensayo ORAC. Para dicha correlación se utilizaron intervalos de trabajo de 10-50 $\mu\text{mol/L}$ y de 1-5 $\mu\text{mol/L}$ de soluciones estándar trolox, para el método en lote y FIA respectivamente.



Gráfica 4. Correlación de % protección de Trolox usando el método FIA y en LOTE, a través del ensayo ORAC.

Para poder comparar el ensayo ORAC por FIA y por lote, se midieron capacidades antioxidantes de ácido cafeico (2 $\mu\text{mol/L}$ por FIA y 4.5 $\mu\text{mol/L}$ por lote), ácido tánico (2.7 $\mu\text{mol/L}$ por FIA y 5.5 $\mu\text{mol/L}$ por lote) y ácido gálico (4.25 $\mu\text{mol/L}$ por FIA y 14.5 $\mu\text{mol/L}$ por lote), por ambos métodos. Los resultados de la Tabla 12 revelan capacidades antioxidantes diferentes en ambos métodos, debido a que las concentraciones utilizadas tanto para reactivos y muestras fueron distintas por ambos métodos, pero se observan tendencias similares en cuanto a las relaciones de capacidad antioxidante entre cada estándar utilizado. Por tanto, el método FIA conserva las proporciones de capacidad antioxidante entre los estándares al igual que el método en lote, pero nos proporciona sus propios valores de capacidad antioxidante.

Tabla 12.-Comparación de valores equivalentes trolox del método en lote y FIA.

Estándares	FIA(Eq.T*)	SD*	LOTE(Eq.T)	SD
Ácido cafeico	2.62	0.11	3.96	0.64
Ácido tánico	2.17	0.34	2.97	0.07
Ácido Gálico	1.27	0.06	1.99	0.24
Ác. cafeico/tánico	1.21	0.19	1.33	0.22
Ác. cafeico/gálico	2.07	0.13	1.99	0.40
Tánico/gálico L	1.72	0.28	1.50	0.18

*Eq. T (μmol equivalente de trolox / μmol del polifenol)

•SD (Desviación estándar)

5.3. Curvas de calibración por HPLC en fase reversa.

La separación por HPLC de una mezcla de 4 estándares (presentes en extractos de vainilla), nos permitió conocer sus parámetros de separación, para utilizarlos en la separación y cuantificación de extractos de vainilla. Usando la programación de gradiente mencionada en la metodología, nos permitió calcular los parámetros cromatográficos, tales como los tiempos de retención (T_r) y la resolución (R_s) de separación entre cada compuesto (Tabla 13).

La separación por HPLC de una mezcla de 9 compuestos utilizando estándares, nos permitió poder simular un ambiente cercano al de un extracto de vainilla, el cual presenta una gran diversidad de compuestos presentes. Usando la programación de gradiente mencionada en la metodología, nos permitió calcular los parámetros cromatográficos, tales como los tiempos de retención (t_r) y la resolución (R_s) de separación entre cada compuesto (Tabla 13).

Tabla 13.- Tiempos de retención y resoluciones presentes en el cromatograma de una mezcla de 9 compuestos.

Núm. OE	Compuesto	t_r	R_s
1	Ácido 3,4-hidroxibenzoico	3.62 +/-0.01	
2	Catecol	4.02 +/-0.01	0.71 +/-0.08
3	Ácido 4-hidroxibenzoico	6.06 +/-0.03	1.97 +/-0.02
4	4-hidroxibenzaldehído	7.67 +/-0.02	1.23 +/-0.03
5	Ácido vanílico	8.74 +/-0.03	0.79 +/-0.03
6	Ácido cafeico	10.21 +/-0.03	1.17 +/-0.05
7	Vainillina	11.32 +/-0.02	0.77 +/-0.06
8	Ácido cumárico	14.15 +/-0.01	1.90 +/-0.09
9	Ácido ferúlico	15.45 +/-0.01	1.31 +/-0.03

Orden de elución (OE)

Después de obtener un cromatograma de la mezcla de 9 compuestos, se elaboraron curvas de calibración para los estándares con orden de elución 3, 4, 5 y 7 con un intervalo lineal de 1-50 $\mu\text{g/mL}$. Los parámetros de linealidad de cada curva de calibración mostrados en la Tabla 14, permitieron determinar las concentraciones de los 4 compuestos presentes en el extracto de vainilla.

Tabla 14.-Parametros de linealidad de las curvas de calibración para los compuestos ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldehído y vainillina.

Compuesto	Intervalo lineal	b	m	r	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LC ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido 3,4-hidroxibenzoico	1-50 $\mu\text{g/mL}$	-2.78E+05	1.97E+06	0.9998	0.37	1.13
4-hidroxibenzaldehído	1-50 $\mu\text{g/mL}$	-1.94E+06	9.11E+06	0.9998	0.08	0.24
Ácido vanílico	1-50 $\mu\text{g/mL}$	-4.89E+05	2.20E+06	0.9998	0.33	1.01
Vainillina	1-50 $\mu\text{g/mL}$	-1.05E+06	4.44E+06	0.9998	0.16	0.50

(r) coeficiente de correlación, (b) ordenada al origen y (m) pendiente.

5.4. Separación y cuantificación por HPLC, en extractos de Vainilla.

Después de realizar 3 extracciones de vainas de vainilla por el método de irradiación por microondas focalizado, se analizó el extracto por HPLC en fase reversa. Las unidades de concentración expresadas en las curvas de calibración fueron de $\mu\text{g/mL}$, pero para poder expresar valores de capacidad antioxidante, las concentraciones de cada compuesto se transformaron a $\mu\text{mol/L}$ (Tabla 15).

Tabla 15.- Concentración de 4 compuestos presentes en extractos de vainilla, a partir de curvas de calibración por HPLC.

Extracto	Ác. PHB $\mu\text{mol/L}$	PHB $\mu\text{mol/L}$	Ác. Vanílico $\mu\text{mol/L}$	Vainillina $\mu\text{mol/L}$
EXT1	95.58 +/-2.31	252.21 +/-0.74	467.10 +/-2.07	3,140.76 +/-7.02
EXT2	90.84 +/-0.77	245.50 +/-0.29	460.29 +/-0.03	3,024.03 +/-1.75
EXT3	82.20 +/-1.16	219.41 +/-0.31	406.23 +/-1.22	2,688.69 +/-1.42
Media	89.54 +/-6.78	239.04 +/-17.33	444.54 +/-33.35	2,951.16 +/-234.68

Ác. PHB (ácido 4-hidroxibenzoico); PHB (4-hidroxibenzaldehído)

5.4.1. Capacidad antioxidante de 4 estándares presentes en el extracto de vainilla.

Para analizar la contribución de la capacidad antioxidante de los 4 compuestos presentes en el extracto de vainilla a partir de sus concentraciones, se determinó la capacidad antioxidante del extracto y la de cada compuesto usando estándares por separado, utilizando unidades de $\mu\text{mol/L}$ de trolox presentados en la Tabla 16, a partir de la curva de calibración de trolox por FIA.

Tabla 16.- Capacidad antioxidante asociada a cada compuesto presente en los extractos.

Compuesto	$[\mu\text{mol /L}]$ trolox
Ác. PHB μM	37.76 +/- 8.55
PHB μM	12.74 +/- 0.95
Ác. Vanílico μM	276.68 +/- 24.67
Vainillina μM	3,179.71 +/- 279.05
Total	3,506.89 +/- 280.27
Extracto	6,172.17 +/- 487.62

Los resultados de la contribución de cada compuesto indicaron que la capacidad antioxidante de un extracto de vainilla es superior en casi el doble a la capacidad antioxidante de la suma de los 4 compuestos a las concentraciones presentes en el extracto, debido a que un extracto de vainilla se encuentran un aproximado de 170 compuestos que incrementan la capacidad antioxidante (de Guzman & Zara, 2012). La vainillina fue el compuesto que proporciona la mayor capacidad antioxidante de la suma de los 4 compuestos, lo que nos lleva a corroborar datos antes informados en la bibliografía (Rojas-López & Cañizares-Macías, 2013; Sinha et al., 2007).

6. Conclusiones

Se logró desarrollar y validar un sistema FIA, para evaluar la capacidad antioxidante de estándares y extractos de vainilla, empleando el ensayo ORAC. El sistema FIA propuesto presentó diversas ventajas entre las que se encuentran: reducción de la manipulación de reactivos por parte del analista, y principalmente el acortamiento del tiempo de análisis de 90 minutos (por el método en microplacas) a 5 minutos. El método ORAC por FIA permite operar de manera continua y es posible analizar aproximadamente 12 muestras hora, lo que hace que el ensayo sea adecuado para la cuantificación de muestras de manera inmediata.

La señal analítica utilizada para la medición de la capacidad antioxidante fue una de las partes medulares de la metodología, debido a que se logró cuantificar en una zona muy diluida del bolo de inyección tomando como principio el factor de dispersión a la hora de introducir los reactivos y muestras al sistema FIA. El ensayo pudo ser cuantificado gracias a que el sistema permite monitorear el grado de la reacción sin la necesidad de que esta alcance equilibrio químico.

Entre las características del método, se destacan valores menores al 4% para los porcentajes de repetibilidad y reproducibilidad, empleando estándares y extractos de vainilla, lo que se encuentra

dentro del rango aceptable por la bibliografía consultada, teniendo así una buena precisión asociada a la reproducibilidad y repetibilidad del método. Es importante destacar que el método FIA presentó un intervalo lineal usando concentraciones 10 veces más pequeñas de trolox en comparación con el método en lote. La sensibilidad del método asociada a la pendiente de la curva de calibración mostró ser 5 veces más alta por el método FIA que por el método en lote. De la misma manera los límites de detección y cuantificación mostraron ser 4 veces más bajo por el método FIA que por el método en lote.

Se obtuvo una correlación mayor al 99% entre el método FIA y el método en microplaca, demostrándose que dicho análisis puede ser llevado a cabo por FIA y correlacionarse directamente con la determinación en lote.

La separación y cuantificación de 4 compuestos presentes en el extracto de vainilla por HPLC, nos permitió poder relacionar la concentración de cada uno con su capacidad antioxidante, destacando así que la mayor capacidad antioxidante de los 4 compuestos evaluados (presentes en el extracto de vainilla) se atribuye al compuesto vainillina, dado que es el compuesto que se encuentra en mayor concentración. Por tanto, para la capacidad antioxidante total para el extracto de vainilla, el compuesto vainillina contribuye en un 50%. El extracto de vainilla presenta el doble de capacidad antioxidante que la vainillina, debido a la influencia de los demás compuestos presentes en el extracto, que aunque no se encuentren en mayor cantidad que la vainillina, contribuyen en conjunto a incrementar la capacidad del extracto.

7. Perspectivas

Con el diseño de la configuración FIA propuesta y las condiciones óptimas para la cuantificación de la capacidad antioxidante se obtuvieron buenos resultados, sin embargo, el uso del reactivo AAPH como portador en un sistema de flujo continuo resulta inconveniente ya que consume una mayor cantidad de reactivo aunque sea más rápido que el método en microplacas. Por tal motivo, se propone mejorar la optimización de la configuración FIA, de tal forma que se reduzca aún más el consumo de reactivos, en donde la solución portadora sea SAF y los reactivos inyectados sean la fluoresceína y el AAPH disminuyendo las concentraciones de la configuración actual. Asimismo, después de mejorar la optimización se espera poder automatizar completamente el análisis, utilizando una bomba peristáltica programable.

8. Referencias

- Cañizares, P. (2002). Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 46, 167–174.
- Cofepris. Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos (2014). México. Retrieved from <https://www.gob.mx/cofepris/documentos/criterios-de-aplicacion>
- de Guzman, C. C., & Zara, R. R. (2012). Vanilla. In *Handbook of Herbs and Spices* (Vol. 1, pp. 547–589). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.547>
- Frankel, E. N., & Finley, J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4901–4908. <https://doi.org/10.1021/jf800336p>
- García, Ma Araceli. Soberón, Evelyn. Cortés, Myriam. Rodríguez, Ramón. Herrera, José Luis. Alcantara, A. (2002). Guía de validación de métodos analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.), 132.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16),

- 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Jaccoulet, E., Schweitzer-Chaput, A., Toussaint, B., Prognon, P., & Caudron, E. (2018). Simple and ultra-fast recognition and quantitation of compounded monoclonal antibodies: Application to flow injection analysis combined to UV spectroscopy and matching method. *Talanta*, *187*(February), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.042>
- Kleszczewski, T., & Kleszczewska, E. (2001). FIA of vitamin C in blood serum in humans at increasing ethanol concentration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *25*(3–4), 477–481. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00510-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00510-0)
- Kolev, S. D. . M. (2008). *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques. Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 54). [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(08\)00615-6](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(08)00615-6)
- Kurbanoglu, S., Unal, M. A., & Ozkan, S. A. (2018). Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds. *Electrochimica Acta*, *287*, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.217>
- Longares-Patrón, A., & Cañizares-Macías, M. P. (2006). Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from vanilla fragans. *Talanta*, *69*(4), 882–887. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.11.030>
- Melchert, W. R., Reis, B. F., & Rocha, F. R. P. (2012). Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Analytica Chimica Acta*, *714*, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.044>
- Mellado-Ortega, E., Zabalgoceazcoa, I., Vázquez de Aldana, B. R., & Arellano, J. B. (2017). Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay. *Analytical Biochemistry*, *519*, 27–29. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.009>
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, *74*, 10–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Nesamony, E., Lakshminarasiah, U., ... Nishigaki, I. (2014). Clinica Chimica Acta Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, *436*, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Rojas-López, A. (2010). *Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de vainilla* (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, CDMX.
- Rojas-López, A., & Cañizares-Macías, M. P. (2013). Antioxidant Capacity in Vanilla Extracts Obtained by Applying Focused Microwaves. *Food and Nutrition Sciences*, *4*(08), 244–253. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.48A030>
- Ruiz-Capillas, C., & Nollet, L. M. L. (2015). *Flow injection analysis of food additives. Flow Injection Analysis of Food Additives* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1201/b19644>
- Ruzicka, J. (2018). Flow Injection Tutorial - “Tutorial & News on Flow Based micro Analytical Techniques.” Retrieved from [http://www.flowinjectiontutorial.com/Theory 0.2.1. Dispersion Models and Reality.html](http://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.2.1.%20Dispersion%20Models%20and%20Reality.html)
- Ruzicka, J., & Hansen, E. H. (1988). *Flow injection analysis. Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 16). [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)81506-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)81506-3)
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sinha, A. K., Verma, S. C., & Sharma, U. K. (2007). Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in Vanilla planifolia. *Journal of Separation Science*, *30*(1), 15–20. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600193>
- Wiesenhofer, T., Francesconi, K. A., & Kuehnelt, D. (2017). A time-efficient flow injection/ICPMS method for the direct determination of total selenium in human urine. *Microchemical Journal*, *130*, 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.10.004>