



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE FLUJO  
CONTINUO PARA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. WILLMANN ANTONIO JIMÉNEZ MORALES**

**Dra. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS  
FACULTAD DE QUÍMICA**



**Posgrado  
Ciencias  
Químicas**

Ciudad Universitaria, CD.MX., marzo de 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

## LUGARES DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO EXPERIMENTAL

- Laboratorio 228 “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F2 perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. María del Pilar Cañizares Macías.
- Laboratorios 315 “Bioquímica de Antioxidantes”, con el apoyo del Dr. José Pedraza Chaverri y el M. en C. Omar Noel Medina Campos. Departamento de Biología. Edificio F1, Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio de “Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental” de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Jorge Luis Guzmán Mar.

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

Willmann Antonio Jiménez-Morales, María del Pilar Cañizares-Macias, José Pedraza-Chaverri. Fast ORAC-SIA method for antioxidant capacity determination in food samples, Food Chemistry, Volume 384, 2022, 132524, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132524>.

Willmann Antonio Jiménez-Morales, María del Pilar Cañizares-Macias. Fast FRAP-SIA method to determine antioxidant capacity, Talanta, 2024, 125813, ISSN 0039-9140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125813>.

## DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

**2021.-** Participación como ponente con el tema “Método rápido en flujo para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de alimentos” en el 6° Simposio Estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas, UABJO, Oaxaca de Juárez, Oax.

**2022.-** Presentación del cartel “Método ORAC-SIA para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de alimentos” en la 17° Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, realizado por la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, Monterrey, N.L.

---

**2023.-** Presentación del cartel “MSFIA method coupled with LC-UV for phthalates determination in beverages packaged in PET bottles” en la cuarta edición de la Conferencia de Carteles por Twitter de LatinXChem, realizado el 16 y 17 de octubre del 2023 de manera virtual.



**JURADO ASIGNADO**

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. José Luz González Chávez         |
| VOCAL      | Dr. Alberto Rojas Hernández          |
| VOCAL      | Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook |
| VOCAL      | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      |
| SECRETARIO | Dra. Martha Patricia García Camacho  |

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de doctorado (No. de becario 620290, CVU 817915).

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM por brindarme la oportunidad de estudiar el doctorado en Ciencias Químicas y concluir mis estudios de manera satisfactoria.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo financiero No. PAPIIT IT200718 y a la Facultad de Química de la UNAM.

A la Subdirección de Programas Institucionales de la Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP), quien, a través del programa de Apoyo a Actividades de Larga Duración, me brindó el apoyo financiero para realizar una estancia de investigación en el laboratorio de "Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental" de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Nuevo León, México.

A mi asesora, la Dra. María del Pilar Cañizares Macías, por depositar su confianza en mí para el desarrollo de esta tesis, le agradezco infinitamente por sus consejos, pláticas, paciencia, amistad brindada y su apoyo incondicional durante todo este tiempo. Espero poder retribuirle en el futuro lo mucho que ha impulsado a mi formación académica y personal.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén y la Dra. Martha Patricia García Camacho, por aportar comentarios asertivos en pro de la conducción de mi proyecto de tesis doctoral.

Al jurado conformado por la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook, Dra. Martha Patricia García Camacho, Dr. Alberto Rojas Hernández y Dr. José Luz González Chávez, les agradezco por todos los comentarios y correcciones en pro del mejoramiento de esta tesis.

Muchas gracias al Dr. Jorge Luis Guzmán Mar, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y ayudarme en todos los trámites necesarios para realizar mi estancia de investigación e instalarme en la ciudad de Monterrey; así como a su grupo de trabajo por hacerme sentir como en casa durante mi estadía en la UANL.

Al Dr. José Pedraza Chaverri y al M. en C. Omar Medina Campos, por facilitarme el uso del equipo Cytation 3 Biotek, para la medición de los ensayos de capacidad antioxidante realizados por microplaca.

Mi más sincero agradecimiento a mis compañeros del laboratorio 228, en especial a Kenia Chávez y Jared López, gracias por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por las pláticas tan divertidas y por sus consejos para la mejora de este trabajo.

Agradezco infinitamente a mis padres Santiago Jiménez y Margarita Morales, hermano Homero Jiménez y especialmente a mi novia Heidi Paola Galván por todo el apoyo brindado durante este proceso de formación, sin su constante apoyo y motivación, este trabajo no hubiera concluido de manera satisfactoria.

◆—————◆  
**ABREVIATURAS**

|  |   |
|--|---|
| %CV                                    | porcentaje de coeficiente de variación                              |
| %PP                                    | porcentaje de protección  |
| %RP                                    | porcentaje de reacción  |
| [Fe(TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>+3</sup> | reactivo de FRAP  |
| μmol                                   | micromol  |
| A <sub>0</sub>                         | absorbancia inicial   |
| A <sub>ABTS</sub>                      | absorbancia del ensayo ABTS   |
| AAPH                                   | diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)                 |
| A <sub>B</sub>                         | absorbancia del blanco  |
| Abs <sub>FRAP</sub>                    | absorbancia del ensayo FRAP   |
| ABTS                                   | 2,2'-azino-bis (3 -etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)            |
| ACN                                    | acetonitrilo  |
| ADN                                    | ácido desoxirribonucleico   |
| ANOVA                                  | análisis de varianza  |
| AOA                                    | actividad antioxidante  |
| As                                     | absorbancia de la muestra   |
| AUC                                    | área bajo la curva  |
| B1                                     | blanco 1  |
| B2                                     | blanco 2  |
| C                                      | concentración real de la muestra                                    |
| C <sub>0</sub>                         | concentración de la muestra en ausencia de convección y<br>difusión |
| C <sub>18</sub>                        | columna enlazada a 18 carbonos                                      |
| CA                                     | capacidad antioxidante  |
| CG                                     | cromatografía de gases  |
| CV                                     | coeficiente de variación  |
| D                                      | coeficiente de dispersión   |
| DBP                                    | ftalato de dibutilo   |
| DCC                                    | diseño compuesto central  |

|             |  |
|-------------|--|
| DEP         | ftalato de dietilo   |
| $S_{PI}$    | desviación estándar de la precisión intermedia             |
| $RSD_{PI}$  | desviación estándar relativa de la precisión intermedia    |
| $RSD_r$     | desviación estándar relativa de la repetibilidad           |
| DFC         | diseño factorial completo                                  |
| DMP         | ftalato de dimetilo  |
| DPPH        | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo                              |
| ED          | disruptores endocrinos                                     |
| $FeCl_3$    | cloruro férrico  |
| FIA         | análisis por inyección en flujo                            |
| FRAP        | poder antioxidante reductor férrico                        |
| $h_0$       | altura de la señal en ausencia de convección y difusión    |
| HC          | bobina de retención  |
| HCl         | ácido clorhídrico  |
| $h_{max}$   | altura máxima de la señal de la muestra                    |
| HPLC        | cromatografía líquida de alta eficiencia                   |
| ICP-MS      | espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente |
| IUPAC       | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada             |
| $K_2S_2O_8$ | persulfato de potasio                                      |
| L           | litros   |
| LC-UV       | cromatografía de líquidos con detección ultravioleta       |
| LOD         | límite de detección  |
| LOQ         | límite de cuantificación                                   |
| MCFIA       | análisis de inyección de flujo multiconmutado              |
| min         | minutos  |
| mL          | mililitros   |
| mm          | milímetros   |
| MPFS        | sistemas de flujo multibombeo                              |
| MSFIA       | análisis de inyección de flujo de múltiples jeringas       |
| nm          | nanómetros   |

|                  |   |
|------------------|---|
| ORAC             | capacidad de absorción de radicales oxígenos                  |
| OS               | estrés oxidativo  |
| PAEs             | ésteres del ácido ftálico                                     |
| PBS              | disolución tampón de fosfato                                  |
| PEEK             | polieteretercetona  |
| PET              | tereftalato de polietileno                                    |
| pH               | $-\text{Log}_{10}$ de la concentración de protones            |
| pKa              | $-\text{Log}_{10}$ de la constante de acidez                  |
| PMT-FL           | fluorímetro de tubo fotomultiplicador FIAlab                  |
| PPC              | corrección automática de la longitud del trayecto fotométrico |
| PTFE             | politetrafluoroetileno  |
| PVC              | cloruro de polivinilo   |
| RC               | bobina de reacción  |
| RNS              | especies reactivas de nitrógeno                               |
| ROS              | especies reactivas de oxígeno                                 |
| DER              | desviación estándar relativa                                  |
| S <sub>B</sub>   | desviación estándar del blanco                                |
| SFA              | análisis por flujo segmentado                                 |
| SIA              | análisis por inyección secuencial                             |
| SPE              | extracción en fase sólida                                     |
| S <sub>r</sub>   | desviación estándar de la repetibilidad                       |
| SV               | válvula de selección  |
| S <sub>y/x</sub> | desviación estándar de la regresión lineal                    |
| t <sub>0</sub>   | valor de t de student calculada                               |
| TAC              | capacidad antioxidante total                                  |
| TAH              | transferencia de un átomo de hidrógeno                        |
| t <sub>c</sub>   | valor de t de student de tablas                               |
| TE               | transferencia de electrones                                   |
| THF              | tetrahidrofurano  |
| TPTZ             | 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina                              |

---

|                |   |
|----------------|---|
| Trolox         | ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico |
| URF            | unidad de referencia fluorescente                                 |
| UV/Vis         | ultravioleta/visible  |
| V              | válvula   |
| VSM            | válvula de selección multiposición                                |
| $\lambda_{em}$ | longitud de onda de emisión                                       |
| $\lambda_{ex}$ | longitud de onda de excitación                                    |
| $\mu\text{L}$  | microlitros   |

ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 14 |
| HIPÓTESIS .....  | 18 |
| CAPÍTULO I .....   | 19 |
| Marco Teórico .....  | 19 |
| 1.1 MÉTODOS DE FLUJO .....   | 19 |
| 1.1.1 Automatización por métodos de flujo .....                                      | 19 |
| 1.1.2 Señal analítica de los métodos de flujo.....                                   | 21 |
| 1.1.3 Dispersión en sistemas de flujo .....  | 21 |
| 1.1.4 Coeficiente de dispersión.....   | 22 |
| 1.1.5 Análisis por inyección secuencial .....  | 24 |
| 1.1.6 Análisis por inyección en flujo de jeringa múltiple .....                      | 30 |
| 1.2 Antioxidantes .....  | 34 |
| 1.2.1 Estrés oxidativo .....   | 35 |
| 1.2.2 Ensayos de actividad/capacidad antioxidante .....                              | 35 |
| 1.2.3 Clasificación de los ensayos de actividad/capacidad antioxidante .....         | 37 |
| 1.2.4 Método ORAC .....  | 38 |
| 1.2.5 Método DPPH.....   | 39 |
| 1.2.6 Método FRAP .....  | 40 |
| 1.2.7 Método ABTS .....  | 41 |
| 1.3 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MÉTODOS DE FLUJO.....                | 41 |
| CAPÍTULO II .....  | 43 |
| Determinación de capacidad antioxidante por SIA, usando los ensayos ORAC y FRAP..... | 43 |
| 2.1 RESUMEN .....  | 43 |
| 2.2 OBJETIVOS .....  | 45 |
| GENERAL.....   | 45 |
| ESPECÍFICOS.....   | 45 |
| 2.3 INTRODUCCIÓN .....   | 46 |
| 2.4 METODOLOGÍA.....   | 50 |
| 2.4.1 Reactivos y disoluciones.....  | 50 |
| 2.4.2 Muestras .....   | 50 |
| 2.4.3 Instrumentos y equipos.....  | 51 |
| 2.4.4. Método ORAC por SIA.....  | 52 |
| 2.4.4.1 Procedimiento del método.....  | 52 |
| 2.4.4.2 Determinación de capacidad antioxidante.....                                 | 54 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.4.3 Determinación del coeficiente de dispersión. ....  | 55        |
| 2.4.4.4 Evaluación de la reacción entre fluoresceína y AAPH. ....                                | 55        |
| 2.4.4.5 Optimización del método ORAC-SIA.....  | 56        |
| <i>Determinación de la secuencia de aspirado.....</i>  | <i>56</i> |
| <i>Parámetros químicos: concentraciones de los reactivos AAPH y fluoresceína</i><br><i>.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Parámetros hidrodinámicos: caudal y volumen de aspirado .....</i>                             | <i>57</i> |
| <i>Tiempo de reacción.....</i>   | <i>57</i> |
| 2.4.4.6 Parámetros estadísticos y de validación .....  | 58        |
| <i>Curva de calibración .....</i>  | <i>58</i> |
| <i>Método ORAC por microplaca .....</i>  | <i>58</i> |
| <i>Recuperaciones .....</i>  | <i>59</i> |
| 2.4.5 Método FRAP por SIA .....  | 60        |
| 2.4.5.1 Procedimiento del método.....  | 60        |
| 2.4.5.2 Determinación de capacidad antioxidante.....   | 61        |
| 2.4.5.3 Evaluación de reacción del ensayo FRAP .....   | 61        |
| 2.4.5.4 Estabilidad del reactivo de FRAP .....   | 62        |
| 2.4.5.5 Optimización del método FRAP-SIA .....   | 62        |
| <i>Orden de la secuencia de aspirado.....</i>  | <i>62</i> |
| <i>Parámetros hidrodinámicos y químicos.....</i>   | <i>63</i> |
| 2.4.5.6 Parámetros estadísticos y de validación método FRAP-SIA.....                             | 64        |
| <i>Curva de calibración del método.....</i>  | <i>64</i> |
| <i>Método FRAP por microplaca .....</i>  | <i>64</i> |
| <i>Recuperaciones .....</i>  | <i>65</i> |
| 2.4.6. Precisión intermedia de ambos métodos SIA .....   | 65        |
| 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 66        |
| 2.5.1 Método ORAC-SIA.....   | 66        |
| 2.5.1.1 Coeficiente de dispersión. ....  | 66        |
| 2.5.1.2 Condiciones de reacción. ....  | 67        |
| 2.5.1.3 Optimización del método.....   | 67        |
| <i>Secuencia de aspirado.....</i>  | <i>67</i> |
| <i>Parámetros químicos del método: concentración de los reactivos.....</i>                       | <i>69</i> |
| <i>Parámetros hidrodinámicos del método: caudal y volumen de aspirado .....</i>                  | <i>72</i> |
| <i>Evaluación del tiempo de reacción del método .....</i>  | <i>74</i> |
| 2.5.1.4 Características del método.....  | 74        |
| <i>Intervalo lineal y curva de calibración .....</i>   | <i>74</i> |



|  |     |
|--|-----|
| <i>Correlación entre los métodos ORAC-SIA y ORAC-microplaca</i> .....                                    | 75  |
| <i>Análisis de muestras</i> .....  | 76  |
| <i>Recuperaciones</i> .....  | 78  |
| 2.5.2 Método FRAP-SIA .....  | 80  |
| 2.5.2.1 Condiciones de reacción del método FRAP-SIA.....   | 80  |
| 2.5.2.2 Estabilidad del reactivo FRAP .....  | 80  |
| 2.5.2.3 Optimización del método.....   | 82  |
| <i>Secuencia de aspirado del método</i> .....  | 82  |
| <i>Parámetros químicos e hidrodinámicos del método</i> .....   | 83  |
| 2.5.2.4 Características del método FRAP-SIA .....  | 86  |
| <i>Intervalo lineal y curva de calibración</i> .....   | 86  |
| <i>Correlación entre los métodos FRAP-SIA y FRAP-microplaca</i> .....                                    | 87  |
| <i>Análisis de muestras</i> .....  | 88  |
| <i>Recuperaciones</i> .....  | 89  |
| 2.5.3 Precisión intermedia de ambos métodos SIA .....  | 90  |
| 2.6 CONCLUSIONES.....  | 92  |
| CAPÍTULO III .....   | 94  |
| Método simultáneo para determinar capacidad antioxidante por SIA, empleando los ensayos ABTS y FRAP..... | 94  |
| 3.1 RESUMEN .....  | 94  |
| 3.2 OBJETIVOS .....  | 96  |
| GENERAL.....   | 96  |
| ESPECÍFICOS.....   | 96  |
| 3.3 INTRODUCCIÓN .....   | 97  |
| 3.4 METODOLOGÍA.....   | 100 |
| 3.4.1 Reactivos y disoluciones.....  | 100 |
| 3.4.2 Muestras .....   | 101 |
| 3.4.3 Instrumentos y equipos.....  | 101 |
| 3.4.4 Procedimiento del método .....   | 102 |
| 3.4.4.1 Cálculo de capacidad antioxidante.....   | 103 |
| 3.4.5 Estudios previos a la optimización .....   | 104 |
| 3.4.5.1 Implementación del ensayo ABTS-SIA .....   | 104 |
| 3.4.5.2 Evaluación de las señales analíticas del método FRAP/ABTS-SIA .                                  | 105 |
| 3.4.6 Optimización del método FRAP/ABTS-SIA.....   | 107 |
| 3.4.6.1 Evaluación del orden de aspirado de la programación secuencial...                                | 107 |
| 3.4.6.2 Optimización de parámetros hidrodinámicos y químicos .....                                       | 107 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.4.7 Características del método .....  | 108 |
| 3.4.7.1 Curvas de calibración.....  | 108 |
| 3.4.7.2 Precisión intermedia.....   | 109 |
| 3.4.7.3 Ensayos FRAP y ABTS por microplaca .....  | 109 |
| 3.4.7.4 Estudio de recuperación.....  | 110 |
| 3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 111 |
| 3.5.1 Estudios previos a la optimización.....   | 111 |
| 3.5.1.2 Evaluación de la señal del sistema FRAP/ABTS-SIA.....                               | 113 |
| 3.5.1.3 Evaluación de la secuencia de aspirado .....  | 116 |
| 3.5.2 Diseño compuesto central (DCC) para la optimización del sistema<br>FRAP/ABTS-SIA..... | 117 |
| 3.5.3 Características del método propuesto .....  | 121 |
| 3.5.3.1 Curva de calibración.....   | 121 |
| 3.5.3.2 Precisión intermedia.....   | 122 |
| 3.5.3.3 Recuperaciones .....  | 123 |
| 3.5.3.4 Correlación entre los métodos FRAP/ABTS-SIA y microplaca.....                       | 124 |
| 3.5.3.5 Aplicación del método FRAP/ABTS-SIA .....   | 125 |
| 3.6 CONCLUSIONES.....   | 126 |
| CONCLUSIONES GENERALES.....   | 127 |
| BIBLIOGRAFÍA .....  | 129 |
| ANEXOS .....  | 136 |
| ARTÍCULOS PUBLICADOS.....   | 143 |

**RESUMEN**

Los métodos de flujo continuo han despertado especial interés en diversas metodologías automatizadas de análisis. Desde que se desarrolló el análisis por flujo segmentado (SFA, por sus siglas en inglés) en 1957, las técnicas de flujo han estado en continua evolución hacia nuevos desarrollos. Además, han ganado importancia para fines clínicos, industriales, y ambientales, ya que permiten determinaciones rápidas altamente reproducibles. Entre las ventajas destacables de los métodos de flujo están la reducción del consumo de reactivos o muestras, la alta precisión del método y la reducción de tiempo de análisis debido a que las reacciones no requieren alcanzar el equilibrio físico y químico. En adición, el control por computadora permite que los sistemas sean ajustables y flexibles para los parámetros del flujo sin requerir la manipulación física. Otro aspecto que considerar es el precio más asequible comparado con los métodos automatizados por microplacas.

En este trabajo se desarrollaron, optimizaron y validaron tres métodos de análisis por inyección secuencial (SIA, por sus siglas en inglés) para determinar capacidad antioxidante: dos sistemas no simultáneos y uno simultáneo. El primer método fue el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) con detección fluorimétrica; el segundo fue el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP, por sus siglas en inglés) con detección espectrofotométrica; y finalmente se desarrolló una metodología para medir simultáneamente capacidad antioxidante usando los ensayos FRAP y radical 2,2'-azino-bis (3 -etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) con detección espectrofotométrica.

Los parámetros químicos e hidrodinámicos de cada método SIA desarrollado fueron optimizados a través de diseños de experimentos de cribado y superficie de respuesta, con la finalidad de maximizar las variables de respuesta. Para asegurar la confiabilidad de los resultados de los métodos, se estimaron parámetros como linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), recobro y su correlación con los métodos de referencia.

Es importante destacar que no se tenían reportes bibliográficos de los 3 métodos SIA desarrollados, por lo que son métodos altamente novedosos para determinar capacidad antioxidante, los cuales mostraron tener una alta precisión, sensibilidad,

y rapidez con respecto a sus contrapartes por microplaca. Los métodos demostraron la versatilidad de los sistemas de flujo para ser implementados en la industria alimentaria, así como la innovación de nuevas formas de implementar ensayos simultáneos.

Esta tesis se encuentra dividida en 3 capítulos en orden cronológico de su realización durante el periodo de estudios de doctorado. El **capítulo I** aborda un marco teórico sobre los métodos de flujo que se utilizaron en esta tesis, así como definiciones de capacidad antioxidante y los métodos que la evalúan. El **capítulo II** describe el desarrollo de dos metodologías por SIA para determinar capacidad antioxidante usando los ensayos ORAC y FRAP de manera individual, con la finalidad de poder implementarlas en simultáneo junto con otros ensayos de capacidad antioxidante. El **capítulo III** describe el desarrollo de un método SIA que conjunta dos ensayos de capacidad antioxidante (FRAP y ABTS) en un mismo análisis, con el objetivo de obtener resultados de capacidad antioxidante de dos ensayos al mismo tiempo.

**ABSTRACT**

Continuous flow methods have aroused particular interest in various automated analysis methodologies. Since segmented flow analysis (SFA) was developed in 1957, flow techniques have continually evolved towards new developments. Furthermore, they have gained importance for clinical, industrial, and environmental purposes since they allow rapid, highly reproducible determinations. Among the notable advantages of flow methods are the reduction in the consumption of reagents and samples, the high precision of the method, and the reduction of analysis times because the reactions do not require reaching physical and chemical equilibrium. In addition, computer control allows systems to be adjustable and flexible for flow parameters without requiring physical manipulation. Another aspect to consider is the more affordable price than automated microplate methods.

In this work, three sequential injection analysis (SIA) methods were developed, optimized, and validated to determine antioxidant capacity: two non-simultaneous systems and one simultaneous. The first method was the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay with fluorimetric detection; the second was the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay with spectrophotometric detection; and finally, a methodology was developed to simultaneously measure antioxidant capacity using FRAP and ABTS assays with spectrophotometric detection.

Each SIA method's chemical and hydrodynamic parameters were optimized through screening and response surface experiment designs to maximize the response variables. To ensure the reliability of the results of the methods, parameters such as linearity, limits of detection and quantification, precision (repeatability and reproducibility), recovery, and their correlation with the reference methods were estimated.

It is essential to highlight that no bibliographic reports of the 3 SIA methods were developed, so they are highly novel methods to determine antioxidant capacity, which were shown to have high precision, sensitivity, and speed concerning their microplate counterparts. The methods demonstrated the versatility of flow systems in the food industry and the innovation of new ways to implement simultaneous tests.

This thesis is divided into three chapters in chronological order of completion during doctoral studies. **Chapter I** addresses a theoretical framework for the flow methods used in this thesis, definitions of antioxidant capacity, and the methods that evaluate it. **Chapter II** describes the development of two methodologies by SIA to determine antioxidant capacity using the ORAC and FRAP assays individually, intending to be able to implement them simultaneously along with other antioxidant capacity assays. **Chapter III** describes developing an SIA method that combines two antioxidant capacity assays (FRAP and ABTS) in the same analysis to obtain antioxidant capacity results from two assays simultaneously.

## **HIPÓTESIS**

Con base en el principio de dispersión de los reactivos de los sistemas de flujo continuo, donde no se llega al equilibrio físico ni químico, provocando un perfil parabólico tipo campana gaussiana del producto de reacción, será posible determinar capacidad antioxidante con métodos como ORAC, FRAP, ABTS de forma individual o simultánea usando la técnica analítica de análisis por inyección secuencial (SIA), de manera precisa y más rápida que los actuales en microplaca.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar, optimizar y validar 3 metodologías analíticas por análisis por inyección secuencial (SIA) para la determinación de capacidad antioxidante, utilizando los ensayos ABTS, ORAC y FRAP.

# CAPÍTULO I

## Marco Teórico

### 1.1 MÉTODOS DE FLUJO

La demanda de información analítica es cada vez mayor y los requerimientos de los laboratorios de investigación y de la industria son cada vez más precisos y complejos. Por ejemplo, se necesita conocer concentraciones bajas de compuestos o analitos en tiempos cada vez más breves y a menor costo<sup>1-3</sup>, lo que ha llevado a buscar alternativas desarrollándose nuevas áreas de investigación en la instrumentación y automatización de procedimientos analíticos para proveer información continua, in situ, en tiempo real y respetuosos con el medio ambiente<sup>3</sup>. Desde que Skeggs desarrolló el análisis por flujo segmentado (SFA, por sus siglas en inglés) en 1957, las técnicas de flujo han estado en continua evolución hacia nuevos desarrollos<sup>4</sup>. Además, han ganado importancia para fines clínicos, industriales y ambientales, ya que permiten determinaciones rápidas altamente reproducibles<sup>5-7</sup>. Desde los inicios de la automatización de los métodos analíticos, se han desarrollado y utilizado varias técnicas de flujo diferentes para aplicaciones analíticas o de monitoreo.

#### 1.1.1 Automatización por métodos de flujo

A partir de los años 70, la creciente demanda de métodos rápidos y medioambientalmente sostenibles propició la investigación y el desarrollo de sistemas automatizados. Los equipos presentaban como ventajas un aumento de la precisión y exactitud y, también, una disminución del costo operacional. Estos sistemas se dividían principalmente en dos grandes grupos: mediciones en lote (batch) y en flujo continuo<sup>8</sup>. Los inconvenientes que presentaban las mediciones en lote eran la adición discreta de disoluciones de muestras y reactivos, la complejidad de sus componentes y su costo. Por su parte, los analizadores de flujo continuo presentaban como desventaja la contaminación entre disoluciones de muestras.

Los métodos de flujo se pueden clasificar en no resolutivos (Análisis por Flujo Segmentado (SFA por sus siglas en inglés), Análisis por Inyección en Flujo (FIA, por sus siglas en inglés), Análisis por Inyección Secuencial (SIA, por sus siglas en inglés), Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFIA, por sus siglas en



inglés), Sistemas de Flujo Multibombéo (MPFS, por sus siglas en inglés), etc.) y resolutivos (técnicas cromatográficas, electroforesis capilar, etc.)<sup>9</sup>. En la **figura 1.1** se presenta una línea de tiempo sobre la evolución de los métodos de flujo y algunas determinaciones analíticas.

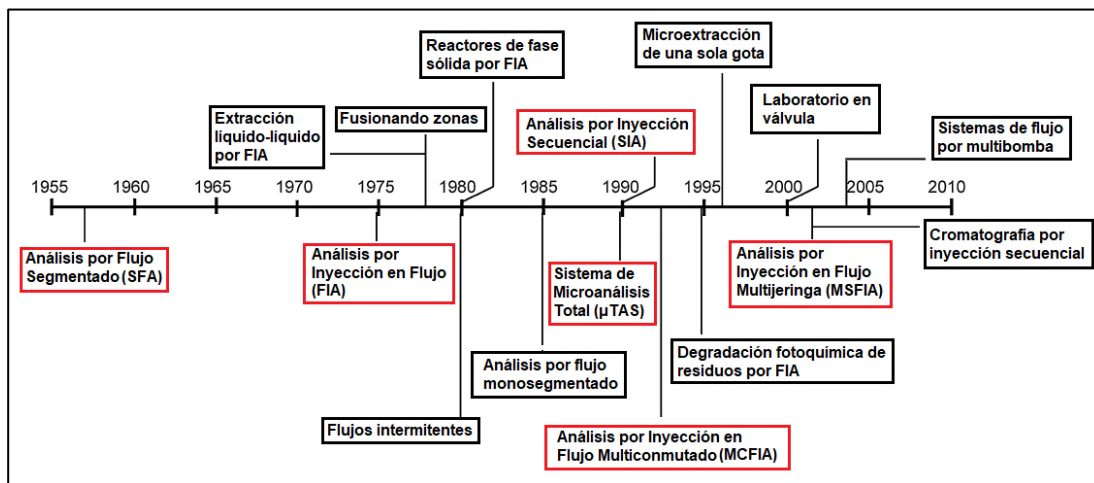


Figura 1.1. Línea del tiempo de la evolución de los métodos de flujo con el paso de los años

Por otra parte, la cantidad y toxicidad de los residuos generados hoy es tan importante como cualquier otra característica analítica al desarrollar un nuevo método analítico. Idealmente, un método ecológico no debe producir desechos químicos, si es así, éstos no deben ser tóxicos y su cantidad debe minimizarse. Además, los desechos tóxicos deben reciclarse y, si es posible, reutilizarse o el método analítico debe incluir el tratamiento y la eliminación de residuos. Aunque no todos los métodos basados en el flujo pueden considerarse métodos ecológicos, ya que la mayoría de ellos están basados en reactivos, éstos contribuyen a reducir el impacto ambiental al reducir el consumo de reactivos y, por lo tanto, la generación de residuos. Además, el progreso de las técnicas de flujo hacia la miniaturización y el ahorro de reactivos ha contribuido a una química analítica más ecológica<sup>10</sup>.

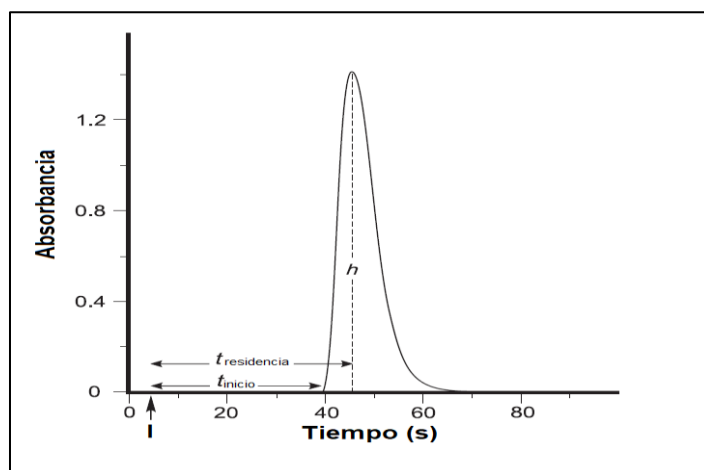
Al inicio, los sistemas de flujo se operaban solo de manera manual, como el SFA y FIA. Sin embargo, las computadoras facilitaron el desarrollo de técnicas computarizadas de flujo controlado como SIA, MCFIA, análisis de inyección de flujo de múltiples jeringas (MSFIA) y MPFS, basadas en la operación de conmutación múltiple<sup>11</sup>. En consecuencia, los métodos de flujo multiconmutado han demostrado un gran potencial en comparación con los métodos de flujo anteriores para minimizar el consumo de reactivos y la producción de residuos<sup>12</sup>, proporcionando metodologías

más respetuosas con el medio ambiente, ya que los líquidos solo se impulsan al sistema cuando es necesario y se devuelven a sus depósitos cuando no. Todos ellos tienen componentes comunes como bombas de impulsión, que actúan como conductores de líquido y una serie de tubería de plástico o colector destinado a transportar corrientes de líquido al detector.

Otra ventaja de los métodos de flujo es la flexibilidad de las computadoras que permiten usar con el mismo hardware, con poca o ninguna alteración, el mismo método analítico en diferentes tipos de muestras con solo alterar el software.

### 1.1.2 Señal analítica de los métodos de flujo

La respuesta analítica de la mayoría de las técnicas de flujo es un pico marcadamente asimétrico, cuya asimetría puede variar dependiendo de las condiciones particulares de operación<sup>13</sup>. La **figura 1.2** muestra un pico típico.

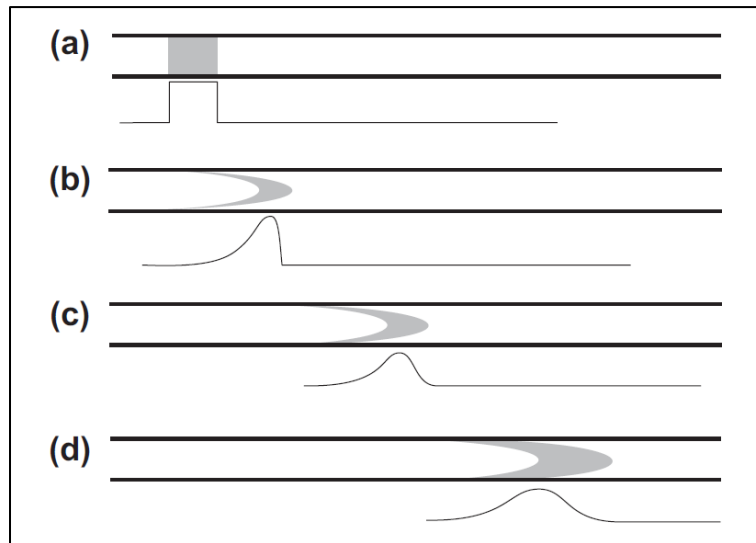


**Figura 1.2.** Señal analítica típica (pico) obtenida con técnicas de flujo. I = punto de inyección;  $h$  = altura del pico;  $t$ -residencia = tiempo de residencia;  $t$ -inicio = tiempo de inicio. Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

### 1.1.3 Dispersión en sistemas de flujo

La forma y la simetría del pico del analito en las técnicas de flujo están dictadas por convección bajo un régimen de flujo laminar y difusión por efecto de gradientes de concentración<sup>14</sup>. En ausencia de fenómenos convectivos y difusivos, un bolo de muestra inyectado que llegue al detector proporcionaría un perfil rectangular (**figura 1.3a**) similar al obtenido en el punto de inyección. Sin embargo, el movimiento del flujo hace que el bolo de muestra adopte un perfil parabólico típico de un régimen de flujo laminar por efecto de la velocidad del líquido en el centro del tubo, que es más alta que en las paredes. La **figura 1.3b** ilustra la alta asimetría de un pico

obtenido bajo flujo predominantemente convectivo. El pico, sin embargo, se vuelve más simétrico por efecto de la creciente prevalencia del flujo difusivo a medida que el tapón de muestra se acerca al detector (**figura 1.3c**); además, la altura del pico se reduce a medida que aumenta la distancia recorrida por el bolo de muestra (**figura 1.3d**).



**Figura 1.3.** Dispersión del pico de la muestra en el punto de inyección (a) y bajo flujo predominantemente convectivo (b), convectivo y difusivo (c) y predominantemente difusivo (d). Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

#### 1.1.4 Coeficiente de dispersión

A medida que transcurre el tiempo del bolo inyectado, el gradiente de concentración produce difusión en una dirección normal al perfil parabólico (**figura 1.4**). Dicha difusión se divide en un componente radial y uno axial que corren perpendicular y paralelo en ambas partes del bolo, respectivamente, al eje de tubería. Este fenómeno difusivo tiende a suavizar los frentes y colas de los picos, lo que resulta en picos más simétricos. Después de que el bolo ha recorrido un largo camino, la difusión prevalece y los picos son cada vez más simétricos y menos altos.

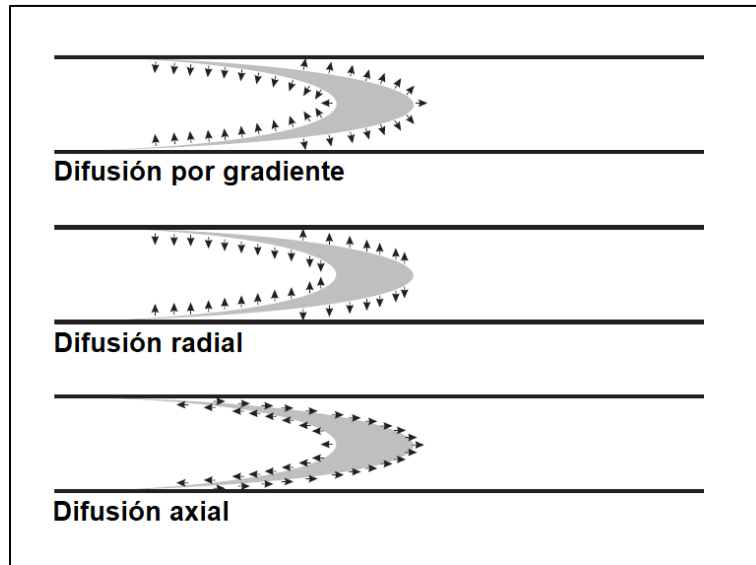


Figura 1.4. Fenómenos difusivos causados por el gradiente de concentración. Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

Así, en los sistemas de flujo es importante definir la difusión (dispersión) del bolo inyectado para establecer las mejores condiciones de mezclado y reacción y obtener la mayor sensibilidad posible.

El coeficiente de dispersión para un bolo de muestra se define como:

$$D = \frac{C_0}{C} \quad \text{Ec. 1.1}$$

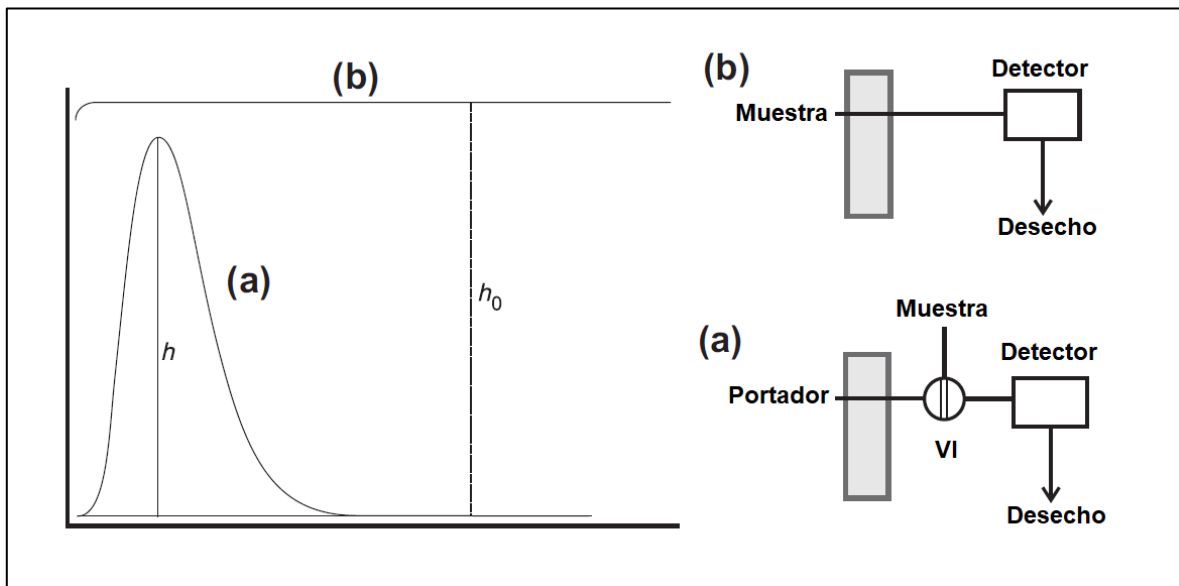
Donde,  $C_0$  es la concentración de la muestra en ausencia de convección y difusión (es decir, la concentración inicial de la muestra) y  $C$  la concentración medida después de pasar por el sistema que será invariablemente inferior a  $C_0$  por efecto de los fenómenos de flujo<sup>15</sup>. Por lo tanto,  $D$  puede variar desde uno en ausencia total de dilución, que en un sistema de flujo no ocurre, hasta valores cada vez mayores a medida que aumenta la dilución. Con frecuencia, este parámetro solo se calcula al máximo del pico, en donde:

$$D_{max} = \frac{C_0}{C_{max}} \quad \text{Ec. 1.2}$$

Si el pico se determina por un método espectrofotométrico que obedece la ley de Beer-Lambert, entonces las concentraciones en esta ecuación pueden ser reemplazadas por las absorbancias respectivas.

$$D_{max} = \frac{h_0}{h_{max}} \quad \text{Ec. 1.3}$$

El coeficiente de dispersión se determina en la práctica al inyectar un colorante en la corriente portadora del sistema y al registrar la señal analítica del bolo cuando llega al detector. La altura máxima ( $h_{\max}$ ) del pico formado por el bolo inyectado se mide en la parte más alta del mismo y se reporta en las unidades registradas por el detector (**figura 1.5a**). Para obtener  $h_0$ , la muestra se puede emplear como portador y de esta manera registrar la señal constante que proporciona el detector (**figura 1.5b**).



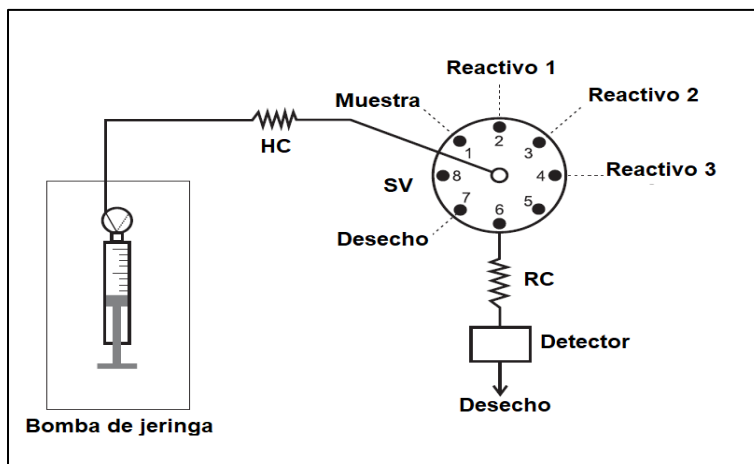
**Figura 1.5.** Determinación del coeficiente de dispersión en FIA: (a) inyección de un volumen de muestra conocido y (b) posterior aspiración de la muestra a través del canal portador. VI: válvula de inyección. Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

Por lo tanto, el coeficiente de dispersión es una función de variables que incluyen el volumen de muestra inyectado, la longitud de la tubería y los caudales, entre otros. La optimización de un sistema de flujo para una aplicación específica requiere un conocimiento previo de la forma en que el coeficiente de dispersión está influenciado por estas variables.

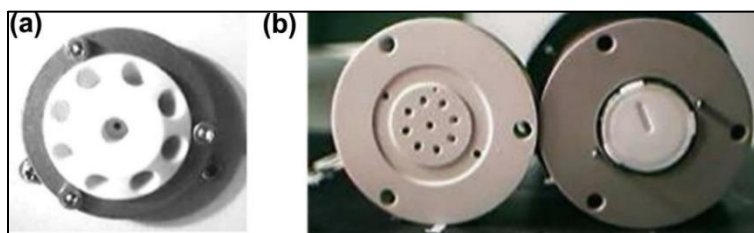
### 1.1.5 Análisis por inyección secuencial

El SIA fue desarrollado en 1989 por J. Ruzicka y G. Marshall como una alternativa al FIA<sup>16</sup> y ha demostrado que su alcance se aparta notablemente del de la técnica anterior.

La **figura 1.6** muestra una representación esquemática de un sistema SIA típico y en la **figura 1.7** se muestra una válvula de selección típica del sistema SIA de baja presión y fabricada con polímeros de polietereceton (PEEK, por sus siglas en inglés) resistentes a productos químicos para el estátor y con politetrafluoroetileno (PTFE) para el rotor.

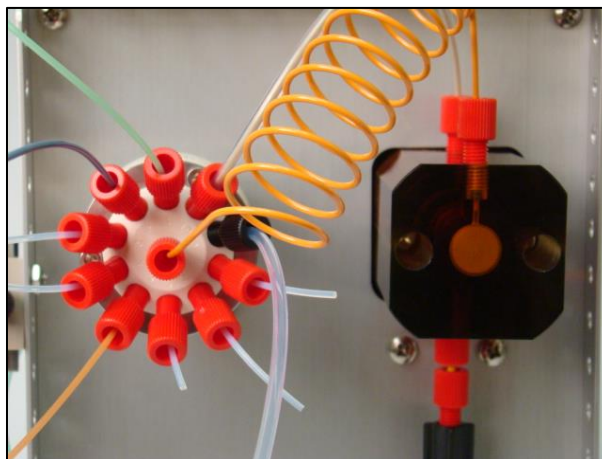


**Figura 1.6.** Representación esquemática de un sistema SIA. HC: bobina de retención, RC: bobina de reacción, SV: válvula de selección. Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>



**Figura 1.7.** (a) Válvula de conmutación utilizada en SIA. (b) Partes internas de la válvula (estator lado izquierdo, rotor lado derecho). Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

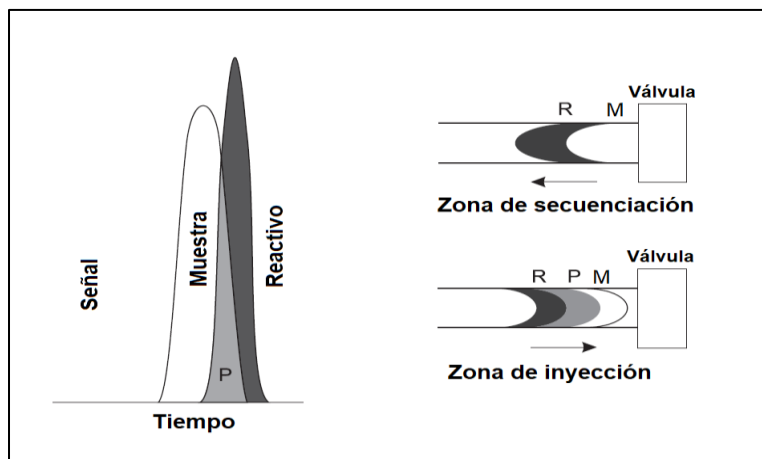
El puerto central de la válvula está conectado a una bomba de pistón bidireccional a través de una bobina de retención, para abordar los puertos periféricos de la unidad, para la aspiración secuencial de los diversos componentes, y también al detector, a través del canal de comunicación central. Los puertos laterales también se pueden utilizar para otros fines, como la descarga de residuos o la conexión a otros dispositivos, por ejemplo, un horno microondas, un sistema de fotooxidación o una cámara de mezcla (**figura 1.8**).



**Figura 1.8.** Módulo de válvula de selección estándar de 10 puertos conectado a la bomba de pistón de un equipo SIA

Por otro lado, una de las características esenciales de SIA es su control computarizado. La computadora selecciona cómo se conecta el puerto central de la válvula a sus puertos laterales, arranca y detiene la bomba para aspirar o dispensar líquidos, selecciona su volumen y ajusta el caudal. Además, el hecho de implementar una computadora hace posible la adquisición y procesamiento de datos. En un sistema SIA que utiliza un solo reactivo, el puerto central de la válvula de conmutación se conecta al canal de muestra y la bomba se ajusta para aspirar un volumen preestablecido de muestra a un caudal bastante bajo para evitar la formación de burbujas. Luego, el puerto central se conecta al puerto lateral apropiado para aspirar un volumen preestablecido de reactivo. A continuación, la válvula se acciona para conectar su puerto central con el canal que conduce al detector y se dispensa un volumen apropiado de portador para conducir la muestra y el reactivo al detector en modo de inversión de flujo<sup>7</sup>.

El SIA trabaja bajo régimen de flujo laminar, exhibiendo la forma asimétrica típica de los picos FIA. Como se puede ver en la **figura 1.9**, la dispersión en un sistema SIA conduce a la superposición de los bolos de la muestra y del reactivo y a la detección de la formación del producto de reacción.



**Figura 1.9.** Superposición de bolo de muestras y reactivos en un sistema SIA. P: producto, R: reactivo, M: muestra. Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

Un colector SIA típico incluye dos tipos de bobinas: una bobina de retención insertada en el canal que conecta la bomba de pistón al puerto central de la válvula de conmutación que evita que la muestra y los reactivos contaminen la bomba del pistón, y una bobina de reacción en el canal que conduce al detector y que está destinada a garantizar una mezcla adecuada entre la muestra y el reactivo para permitir que se forme una cantidad detectable de producto de reacción.

A diferencia del FIA, el SIA se puede convertir en un verdadero sistema de análisis multiparamétrico simplemente utilizando una válvula de conmutación con un número adecuado de canales para contener los diferentes reactivos analíticos, cuya administración puede programarse con precisión a través del software de computadora. En este sentido, SIA está mucho más cerca de SFA en capacidades multiparamétricas, pudiendo determinar hasta 20 parámetros por muestreo, excepto que SIA opera de una manera mucho más simple, ecológica y, sobre todo, económica.

Actualmente, las válvulas de conmutación disponibles pueden tener más de 20 puertos laterales. Además, el número de puertos se puede aumentar conectando un puerto lateral en una válvula al puerto central de varios otros. Un grado tan alto de capacidad de expansión es exclusivo de SIA, ninguna otra técnica de flujo puede igualar a SIA en capacidades de determinación multiparamétrica. Por lo tanto, SIA es una excelente herramienta para desarrollar analizadores automáticos con capacidades multiparamétricas (**tabla 1.1**).



**Tabla 1.1.** Características del análisis de inyección secuencial

| Parámetros                   | Valores                       |
|------------------------------|-------------------------------|
| Volumen de muestra inyectado | 50–150 µL                     |
| Tiempo de respuesta          | 3–60 s                        |
| Diámetro del tubo            | 0.8 mm                        |
| Condiciones de detección     | Equilibrio no necesario       |
| Rendimiento                  | Alrededor de 70 inyecciones/h |
| Precisión                    | 1–2 %                         |
| Consumo de reactivo          | Muy bajo                      |
| Ciclo de lavado              | Innecesario                   |
| Métodos cinéticos            | Factible                      |
| Titulaciones                 | Factibles                     |
| Tipo de respuesta            | Pico                          |
| Parámetro medido             | Altura o área del pico        |

Publicado en 2014 por Víctor Cerdà<sup>9</sup>

El SIA revela algunas diferencias comparado con el FIA, entre las cuales destaca el consumo drásticamente reducido de muestras y reactivos en SIA; esto, sin embargo, no es el resultado del uso de volúmenes inyectados más pequeños, sino más bien de la forma en que funciona un sistema SIA. En la operación FIA, el consumo de muestras y reactivos es prácticamente independiente de la frecuencia de análisis, ya que la bomba peristáltica impulsa continuamente la muestra y los reactivos a un caudal<sup>17,18</sup> constante en todo momento. Sin embargo, en el SIA la bomba de pistón solo funciona durante el tiempo estrictamente necesario para aspirar la cantidad de muestra y reactivo necesarios para una determinación dada. La aspiración de una cantidad adicional de muestra solo es necesaria cuando la muestra se reemplaza por una diferente, ya que la muestra anterior debe eliminarse completamente del tubo de aspiración para evitar el arrastre. Por ejemplo, un método SIA para determinar el ion amonio en las aguas residuales utiliza 10 veces menos reactivos que un método FIA comparable<sup>19</sup>; esto es de gran importancia económica y práctica, especialmente con equipos que están destinados a funcionar sin supervisión durante largos períodos, por ejemplo, un método analítico automatizado.

Además, debido al hecho de emplear bombas de pistón, SIA es más robusto que otras técnicas de flujo que utilizan bombas peristálticas. Las bombas peristálticas utilizan tubos de materiales que se dañan con relativa facilidad por algunos fluidos, a saber, ácidos, bases y, especialmente, disolventes; por el contrario, las bombas de pistón utilizan tubos de vidrio y teflón, que son materiales altamente inertes y

garantizan una larga vida útil. Además, es importante recordar que en SIA, la muestra, los reactivos y los disolventes rara vez llegan al sistema de propulsión, que solo contiene la disolución portadora como máximo.

Una dificultad de la operación de SIA surge de la forma en que se apilan los aspirados de volúmenes; esto dificulta la mezcla de la muestra y los reactivos, especialmente con más de dos. Otra solución factible en determinaciones que involucran muchos reactivos es usar una cámara de mezcla en uno de los puertos laterales para homogeneizar las diferentes mezclas de muestra / reactivo con la ayuda de un agitador magnético para la extracción de pequeñas alícuotas, según sea necesario<sup>20</sup>.

Uno de los mayores obstáculos iniciales para el desarrollo de SIA fue la necesidad de usar una computadora para controlar el sistema. Esto resultó en el desarrollo de apenas unas pocas decenas de métodos durante su primer año de existencia. La escasez de software disponible comercialmente y la falta de experiencia en la interfaz de computadoras con instrumentos analíticos causaron el lento desarrollo de SIA inicialmente, a pesar de sus ventajas comprobadas. Solo durante la última década, con el inicio del software comercial, SIA ha ganado terreno en el campo de los análisis de rutina.

Aun cuando, lo que primero fue un obstáculo para el desarrollo de SIA ha resultado en una de sus mayores ventajas frente a las técnicas de flujo anteriores. Por lo tanto, el hecho de ser una técnica computarizada hace que los tiempos de residencia ya no necesiten controlarse a través de la longitud de los tubos del colector y los caudales de una bomba peristáltica; más bien, son controlados de una manera altamente reproducible por la computadora. Además, la capacidad de ajustar el caudal requerido en cada paso del proceso y cambiarlo a voluntad en cualquier momento, hacen de SIA una herramienta analítica altamente flexible. En los sistemas FIA para implementar un método diferente con frecuencia se modifica la configuración del colector, por el contrario, en los sistemas SIA rara vez se requiere cambiar la configuración para implementar otro método y solo es necesario usar un archivo informático diferente que contenga el procedimiento adecuado. En este contexto, una válvula de conmutación con un número adecuado de puertos se puede utilizar para contener los reactivos necesarios para varias determinaciones

en diferentes puertos, por lo que simplemente elegir el archivo de configuración apropiado generalmente será suficiente para determinar otro parámetro analítico. La incorporación de computadoras en los sistemas SIA también ha facilitado la implementación de métodos con flujo detenido. Basta con calcular el volumen de portador que se entregará y detener el sistema cuando se obtiene un pico en el detector para implementar fácilmente diversas metodologías analíticas, incluidos los métodos clásicos de extracción cinética, espectrofotométrica, voltamétrica, etc. Además, las computadoras han aumentado la flexibilidad de los sistemas analíticos al permitir una serie de operaciones que imitan las realizadas manualmente. Las muestras pueden ser aspiradas y mezcladas con un reactivo; su mezcla conducida a un fotorreactor; y una alícuota retirada, enviada a una unidad de preconcentración en fase sólida y eluida de ella con el fin de detectar secuencialmente los analitos mediante el uso de varios detectores que se pueden organizar en serie en el mismo puerto.

#### **1.1.6 Análisis por inyección en flujo de jeringa múltiple**

El MSFIA fue desarrollado en 1999 por Víctor Cerdá en cooperación con la firma Crison y el objetivo era combinar las ventajas de las técnicas de flujo anteriores evitando sus desventajas<sup>21</sup>. Fue diseñado como una novedosa técnica multicanal que combina la operación multicanal y el alto rendimiento de inyección de FIA con la robustez y la versatilidad de SIA. La **figura 1.10** muestra una bureta típica de jeringa múltiple para su uso en MSFIA.

El dispositivo consiste en una bureta de valoración automática convencional que puede equiparse con hasta cuatro jeringas, que se utilizan como controladores líquidos. Cada jeringa tiene una válvula solenoide de tres vías (N-Research, Caldwell, NJ) en la parte superior, lo que facilita la aplicación de esquemas de multiconmutación. Los pistones están montados en una barra de acero común accionada por un motor de paso único (40 000 pasos). Por lo tanto, todos los pistones se mueven de manera simultánea y unidireccionalmente para la entrega de líquido (dispensación) o aspiración (recogida); esto es equivalente a usar una bomba peristáltica multicanal en FIA, pero evita las desventajas de su frágil tubería y las frecuentes recalibraciones<sup>22</sup>. La relación de caudales entre canales puede modificarse mediante el uso de jeringas de dimensiones transversales apropiadas,

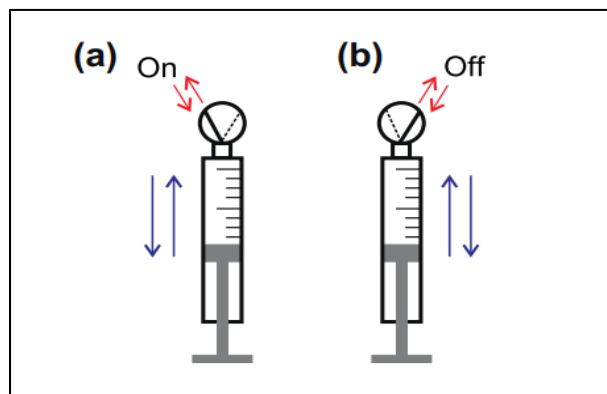
de manera similar a los diámetros de tubería en FIA. El motor paso a paso puede alcanzar el desplazamiento total, correspondiente a 40 000 pasos, entre 20 y 1 024 segundos, proporcionando un amplio intervalo de velocidad. Por lo tanto, el módulo multijeringa permite un manejo preciso de microlitros y un amplio intervalo de caudal (0.057-30 mL/min, dependiendo del volumen de la jeringa 1-10 mL). Las jeringas de 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 25 mL se encuentran disponibles comercialmente, lo que permite un amplio intervalo de caudal y una gran combinación. La alta robustez química es proporcionada por el uso de polímeros resistentes como poli(etileno-co-tetrafluoroetileno) (válvulas superiores) y PTFE (cabezales de pistón y aletas de poppet).



**Figura 1.10.** Vista frontal de una bureta MSFIA de Crison Instruments

Las válvulas solenoides ubicadas en los cabezales de las jeringas funcionan bajo el comando “On” indicando el paso al sistema y “Off” el paso al depósito, permitiendo de esta manera cuatro tipos de desplazamiento de líquido: On-dispensar, Off-dispensar, On-aspirar y Off-aspirar (**figura 1.11**).

Cuatro puertos traseros (**figura 1.12**) permiten la alimentación de válvulas externas de multiconmutación adicionales (válvulas solenoides), microbombas u otros instrumentos, ya sea directamente o a través de un paso que permite el control remoto del software (por ejemplo, espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)). Esto amplifica las posibilidades de construir redes de flujo sofisticadas (véase la **figura 1.13**).



**Figura 1.11.** Representación esquemática de las válvulas solenoides colocadas en el cabezal de cada jeringa. (a) Solenoide activado: posición "On" y (b) Solenoide desactivado: posición "Off"



**Figura 1.12.** Conexiones traseras de una bureta multijeringa

Las válvulas solenoides externas se utilizan comúnmente para impulsar los líquidos en sistemas basados en flujo. El voltaje de corriente directa de cada puerto puede ser controlado por computadora, hasta un valor máximo de 12 volts y una corriente máxima de 0.5 Amperios, lo que permite la conexión de hasta tres válvulas solenoides externas a cada puerto. Como se dijo anteriormente, los sistemas MSFIA combinan algunas de las ventajas de las técnicas de flujo descritas anteriormente, como son: el alto rendimiento de FIA resultado de la incorporación paralela de la muestra y los reactivos, conduciendo a una mejor eficiencia de mezcla en relación con SIA; la robustez de SIA, debido a que los líquidos solo entran en contacto con las paredes de las jeringas de vidrio y los tubos de teflón, sin requerir tubos de bomba peristáltica; el bajo consumo de muestras y reactivos de SIA mediante la implementación de multiconmutación, ya que los líquidos entran al sistema solo

cuando es necesario; la alta flexibilidad de los colectores SIA (caudales y volúmenes propulsados definidos con precisión mediante el control remoto basado en software); la capacidad de usar válvulas solenoides MCFIA, que se pueden accionar sin la necesidad de detener sus pistones<sup>23</sup>.

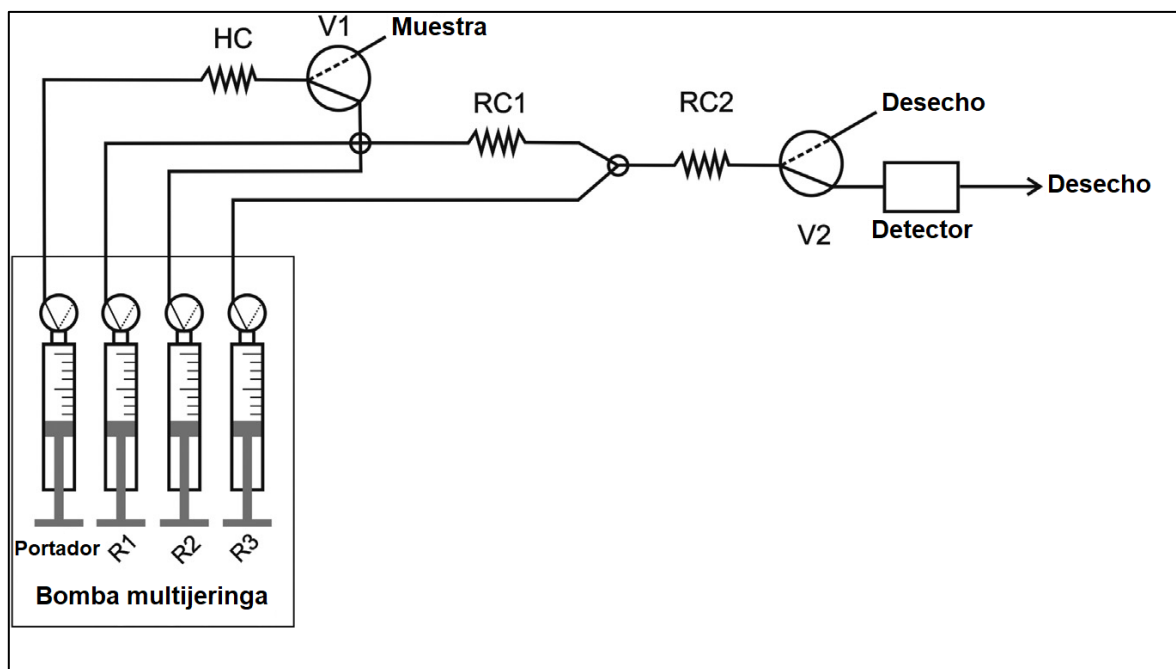


Figura 1.13. Representación esquemática de un sistema MSFIA. HC: bobina de retención, R: reactivo, RC: bobina de reacción, V: válvula. Imagen modificada de Víctor Cerdà en 2014<sup>9</sup>

Tabla 1.2. Características del análisis de inyección de flujo de múltiples jeringas

| Parámetros                                   | Valores                        |
|--|--------------------------------|
| Volumen de muestra inyectado                 | 50–150 $\mu\text{L}$           |
| Tiempo de respuesta                          | 3–60 s                         |
| Diámetro del colector y tubo de muestra      | 0.8 mm                         |
| Diámetro del tubo de aspiración de reactivos | 1.5 mm                         |
| Condiciones de detección                     | Equilibrio no necesario        |
| Rendimiento                                  | Alrededor de 100 inyecciones/h |
| Precisión                                    | 1–2 %                          |
| Consumo de reactivo                          | Muy bajo                       |
| Ciclo de lavado                              | Innecesario                    |
| Métodos cinéticos                            | Factible                       |
| Titulaciones                                 | Factibles                      |
| Tipo de respuesta                            | Pico                           |
| Parámetro medido                             | Altura o área del pico         |

Publicado en 2014 por Víctor Cerdà<sup>9</sup>

Mediante el uso de jeringas móviles paralelas como controladores líquidos, también se superan las deficiencias del bombeo peristáltico, como la pulsación, la recalibración requerida de los caudales y las limitaciones con respecto a los reactivos aplicables. Por lo tanto, MSFIA es una técnica multicanal ideal para

procedimientos analíticos desafiantes, que requieren caudales altos y precisos, y alta estabilidad de presión, como aquellos con la implementación de columnas absorbentes<sup>24</sup>, lo que permite al mismo tiempo, el manejo de disoluciones agresivas y volátiles. La única desventaja de MSFIA frente a otras técnicas de flujo es el llenado periódico de jeringas que causa una frecuencia de inyección más baja que el uso de un enfoque FIA.

El uso alternativo de dos buretas permite duplicar el rendimiento hasta 200 inyecciones por hora (**tabla 1.2**). A diferencia del FIA, el MSFIA requiere el uso de una computadora para controlar el sistema. Esto, sin embargo, no plantea ningún problema especial ya que una variedad de software asequible para implementar cualquier técnica de flujo ya está disponible.

## 1.2 Antioxidantes

En las últimas décadas se han realizado cambios significativos en la definición de “antioxidantes”. Estos antioxidantes han reflejado grandes avances en la ciencia de los alimentos, la nutrición y la biología molecular y celular<sup>25–27</sup>. Actualmente, los antioxidantes ya no son considerados solo sustancias químicas que hacen que un alimento dure más, sino también compuestos fitoquímicos, como los polifenoles y los carotenoides, que muestran una actividad/capacidad antioxidante (AOA/TAC, por sus siglas en inglés) más fuerte que la vitamina C o E en una reacción química. En 1995, los antioxidantes se definieron ampliamente como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato”<sup>28</sup>. Posteriormente se modificó la palabra “oxidación” a “daño oxidativo”, que sugiere un proceso biológico in vivo: “cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo de una molécula diana”<sup>29</sup>. Más recientemente, Apak y colaboradores en 2016, dieron una definición más específica: “sustancias naturales o sintéticas que pueden prevenir o retrasar el daño celular oxidativo causado por oxidantes fisiológicos que tienen potenciales de reducción claramente positivos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) y radicales libres”<sup>30</sup>.

Estas definiciones esclarecen las funciones de los antioxidantes a nivel celular en los seres humanos, ya que están relacionados con el estrés oxidativo y los radicales libres y, además, con los posibles efectos sobre la salud en los seres humanos.

### **1.2.1 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo (OS, por sus siglas en inglés), definido como el desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, se caracteriza por la incapacidad de los antioxidantes endógenos para contrarrestar el daño oxidativo en tejidos y organismos debido a la sobreproducción de ROS/RNS celular, que son altamente reactivos y pueden causar la modificación oxidativa de macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN, y que conducen a lesiones tisulares, muerte celular acelerada<sup>31</sup> y diversas enfermedades como aterosclerosis, diabetes mellitus, inflamación crónica, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer<sup>32</sup>, deterioro cognitivo leve<sup>33</sup>, enfermedad de Parkinson<sup>34</sup> y ciertos tipos de cáncer. El OS por ROS/RNS es importante en la etiología de estas enfermedades crónicas. Abundante evidencia sugiere que los antioxidantes son fundamentales en mantener la salud humana y prevenir y tratar estas enfermedades por su capacidad para reducir el OS. Por lo tanto, medir el AOA/TAC de los alimentos y las muestras biológicas es crucial para garantizar la calidad de los alimentos funcionales y los nutracéuticos, y es más importante para la eficacia de los antioxidantes dietéticos en la protección y tratamiento de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. A lo largo de los años se han desarrollado muchos ensayos AOA/TAC, basados en diferentes mecanismos químicos, fisicoquímicos y bioquímicos. Si bien los mecanismos de algunos ensayos se comprenden claramente, algunos son sistemas complejos con múltiples modos de acción. Se han realizado varios intentos para categorizar los diversos ensayos AOA/TAC<sup>35,36</sup>, pero hasta el momento no existe un sistema unificado y estandarizado para la nomenclatura y clasificación de estos ensayos.

### **1.2.2 Ensayos de actividad/capacidad antioxidante**

El concepto de AOA/TAC se remonta a su origen en la química y luego a sus aplicaciones en la ciencia de los alimentos, en biología y medicina, y en nutrición y epidemiología. Con los años se han usado muchos términos para este concepto,



incluida la actividad antioxidante, la capacidad antioxidante, el poder o el potencial antioxidantes, que significan casi lo mismo: la capacidad de un compuesto o una mezcla de compuestos para prevenir o detener las reacciones oxidativas de otra molécula<sup>37</sup>. También se han utilizado otros términos, como rendimiento antioxidante total, efecto y estado antioxidantes, aunque con menor frecuencia. Mientras tanto, independientemente de estas terminologías, se han dado aún más nombres a los métodos de ensayo utilizados para medir la actividad antioxidante o términos similares coronados con la palabra “total”. Además, debido a la gran cantidad de métodos de ensayo diferentes, la comparación de diferentes alimentos o los efectos fisiológicos de diferentes alimentos puede ser muy desafiante y, a menudo, se comparan manzanas con naranjas. Un enfoque sistemático es fundamental para la industria de alimentos, nutracéuticos y suplementos dietéticos, para una mejor comprensión de la relación entre la dieta y las enfermedades crónicas. La mayoría de los ensayos AOA/TAC actuales se nombran según los reactivos, el mecanismo de reacción o las técnicas correspondientes, y se resumen en la **tabla 1.3**.

**Tabla 1.3.** Métodos analíticos de evaluación de capacidad antioxidante dividido en distintas categorías. Modificado de Pisoschi en 2012<sup>38</sup>

| Ensayo                          | Principio del método   | Determinación del producto final   |
|---------------------------------|--|--|
| <b>Espectrometría</b>           |  |  |
| DPPH                            | Reacción antioxidante con un radical orgánico  | Colorimetría   |
| ABTS                            | Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico  | Colorimetría   |
| FRAP                            | Reacción antioxidante con un complejo de Fe (III)  | Colorimetría   |
| PFRAP                           | Reducción de ferricianuro de potasio por antioxidantes y posterior reacción de ferrocianuro de potasio con Fe (III)  | Colorimetría   |
| CUPRAC                          | Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes  | Colorimetría   |
| ORAC                            | Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propano)  | Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína  |
| HORAC                           | Capacidad antioxidante para disminuir los radicales OH generados por un sistema tipo Fenton basado en Co (II)  | Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína  |
| TRAP                            | Capacidad antioxidante para eliminar los radicales derivados del luminol, generados a partir de la descomposición de AAPH  | Disminución de quimioluminiscencia   |
| Fluorimetría                    | Emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética de una longitud de onda diferente  | Registro de espectros de excitación/emisión de fluorescencia   |
| <b>Técnicas electroquímicas</b> |  |  |
| Voltametría cíclica             | El potencial de un electrodo de trabajo varía linealmente desde un valor inicial hasta un valor final y viceversa, y se registra la intensidad de corriente respectiva                               | Medida de la intensidad del pico catódico/ anódico   |
| Amperometría                    | El potencial del electrodo de trabajo se establece en un valor fijo con respecto a un electrodo de referencia  | Medida de la intensidad de la corriente generada por la oxidación/reducción de un analito electroactivo  |
| Biamperometría                  | La reacción del analito (antioxidante) con la forma oxidada de un par redox indicador reversible   | Medida de la corriente que fluye entre dos electrodos de trabajo idénticos, con una pequeña diferencia de potencial e inmersos en una disolución que contiene la muestra analizada y un par redox reversible |
| <b>Cromatografía</b>            |  |  |
| CG                              | La separación de los compuestos de una mezcla se basa en el reparto entre una fase estacionaria líquida y una fase móvil gaseosa   | Ionización de llama o detección de conductividad térmica   |
| HPLC                            | La separación de los compuestos en una mezcla se basa en el reparto entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida con diferentes polaridades, a alto caudal y presión de la fase móvil | Detección UV-VIS (por ejemplo, matriz de diodos), fluorescencia, espectrometría de masas o detección electroquímica  |

### 1.2.3 Clasificación de los ensayos de actividad/capacidad antioxidante

En cuanto a la clasificación de los ensayos AOA/TAC, Niki en 2010 clasificó los ensayos de antioxidantes en *in vitro* e *in vivo*, según sus aplicaciones, mientras en 2013 Sahu y Saxena propusieron dos sistemas basados en los mecanismos de acción <sup>39</sup>:

- 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, que 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.

#### 1.2.4 Método ORAC

El ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente aceptado como una herramienta estándar para medir la capacidad antioxidante en las industrias nutracéuticas, 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  $\beta$ -ficoeritrina, para formar un producto no fluorescente, que se podía cuantificar indirecta y 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<sup>40</sup>. 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<sup>41</sup>. 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<sup>42</sup>. En la **figura 1.14** se puede observar la secuencia de reacción presentada en el ensayo ORAC.

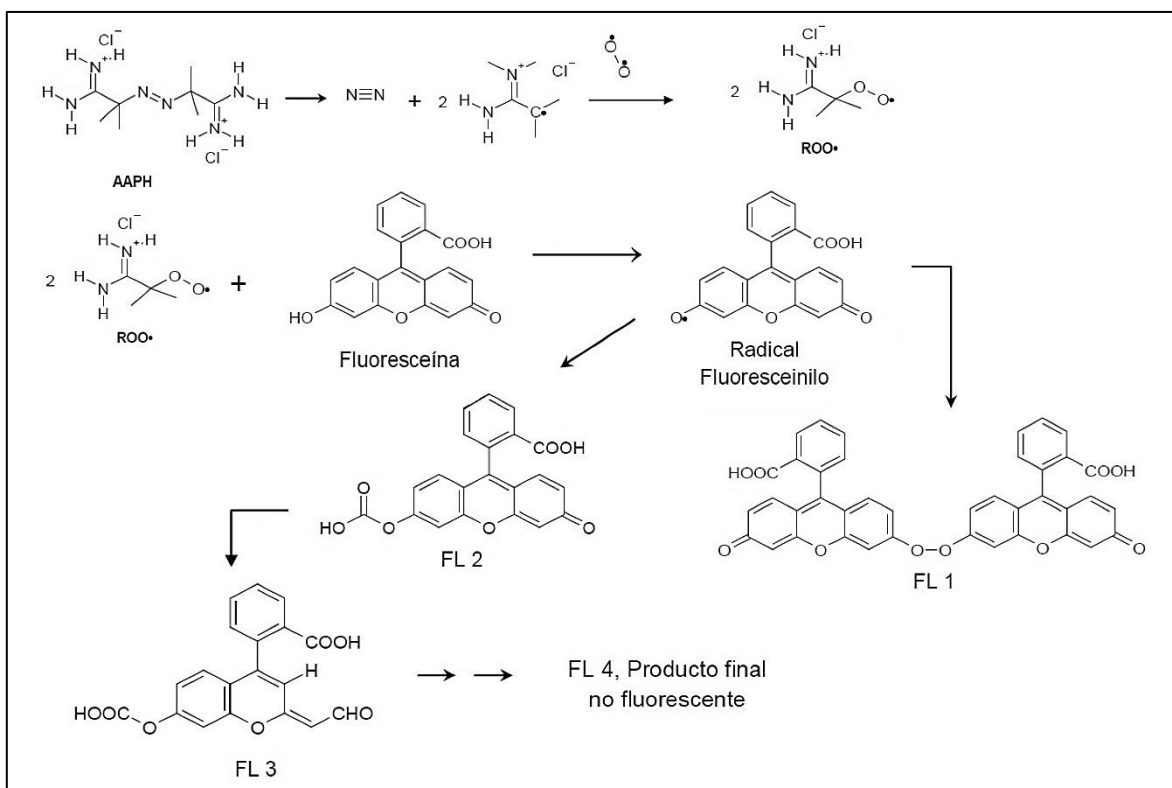


Figura 1.14. Secuencia de reacción del ensayo ORAC. Imagen modificada de Boxin Ou 2001<sup>43</sup>

### 1.2.5 Método DPPH

Brand-Williams y colaboradores desarrollaron por primera vez el método de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés) en 1995 y actualmente es uno de los más empleados para analizar la capacidad antioxidante de los alimentos<sup>44-46</sup>. El radical DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados orgánicos estables y está disponible comercialmente. Este método se basa en una medida del consumo del radical DPPH por parte de un compuesto antioxidante (generalmente compuestos fenólicos). El método de detección por espectrofotometría es el más utilizado para evaluar la capacidad de decoloración del radical DPPH, al monitorear la disminución de la absorbancia del radical DPPH tras la reacción. Sin embargo, se han aplicado otras técnicas de detección para evaluar el consumo del radical DPPH, como la resonancia de espín electrónico (EPR, por sus siglas en inglés) y técnicas electroquímicas.

En la **figura 1.15** podemos observar un esquema de reacción entre el radical DPPH y un antioxidante, presentando los cambios estructurales y de decoloración en la reacción al llevar a cabo el ensayo.

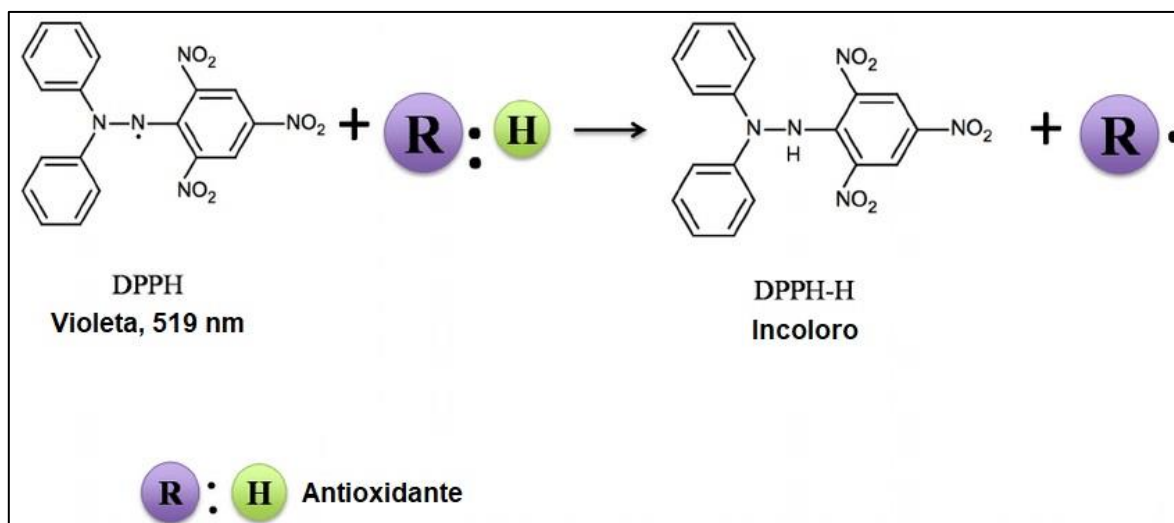


Figura 1.15. Esquema de reacción del ensayo DPPH para determinación de capacidad antioxidante. Imagen modificada de Ningjian Liang en 2014<sup>47</sup>

### 1.2.6 Método FRAP

El ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP, por sus siglas en inglés) fue propuesto por primera vez por Benzie y Strain en 1996, este ensayo es clasificado como un método de transferencia de electrones y se basa en la capacidad antioxidante que tiene una muestra para reducir las especies oxidantes<sup>48</sup>. Esta prueba simula la donación de electrones de una muestra de antioxidante a una especie oxidante, representada por  $\text{Fe}^{+3}$  en exceso estequiométrico que se convierte en  $\text{Fe}^{+2}$  cuando se reduce y se evalúa mediante el cambio de color al formar un complejo con TPTZ a pH bajo (**figura 1.16**). Los valores de capacidad antioxidante se obtienen comparando el cambio de absorbancia a 593 nm en las mezclas de reacción que contienen iones ferrosos u otro estándar antioxidante.

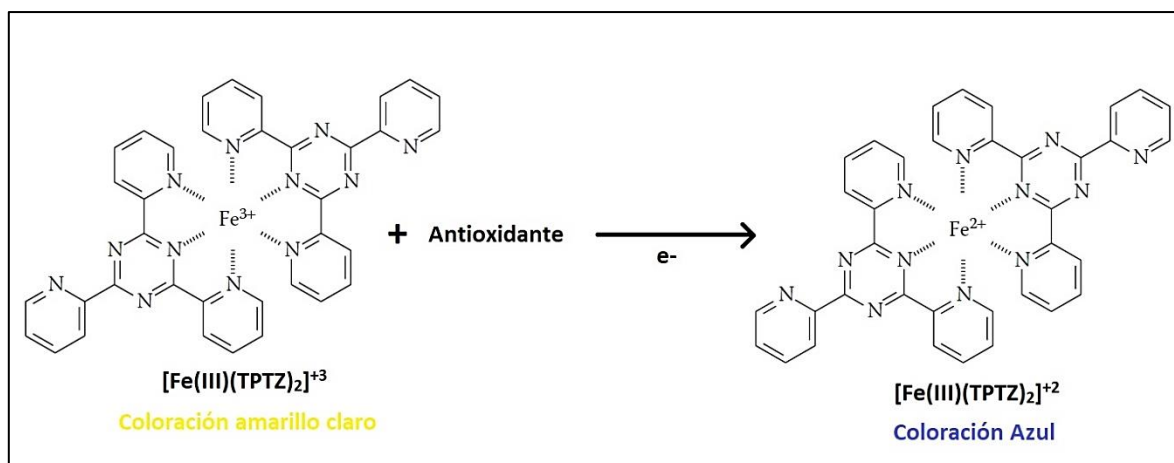


Figura 1.16. Reacción de capacidad antioxidante por el método FRAP. Imagen modificada de Dejian Huang en 2005<sup>40</sup>.

### 1.2.7 Método ABTS

El ensayo del radical 2,2'-azino-bis (3 -etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) fue propuesto por primera vez por Nicholas y colaboradores en 1993 y ha sido implementado ampliamente desde su creación debido a su practicidad por ser un radical colorido estable sin restricciones de pH y medio acuoso para su preparación a diferencia del radical DPPH<sup>49-51</sup>.

Inicialmente, el radical ABTS puede ser oxidado por persulfato de potasio, dando lugar al radical catiónico (ABTS<sup>•+</sup>) que absorbe a 743 nm (color verde azulado) y está formado por la pérdida de un electrón por parte del átomo de nitrógeno de ABTS. Después, en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno, el átomo de nitrógeno capta el átomo de hidrógeno, produciendo la decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup> (figura 1.17).

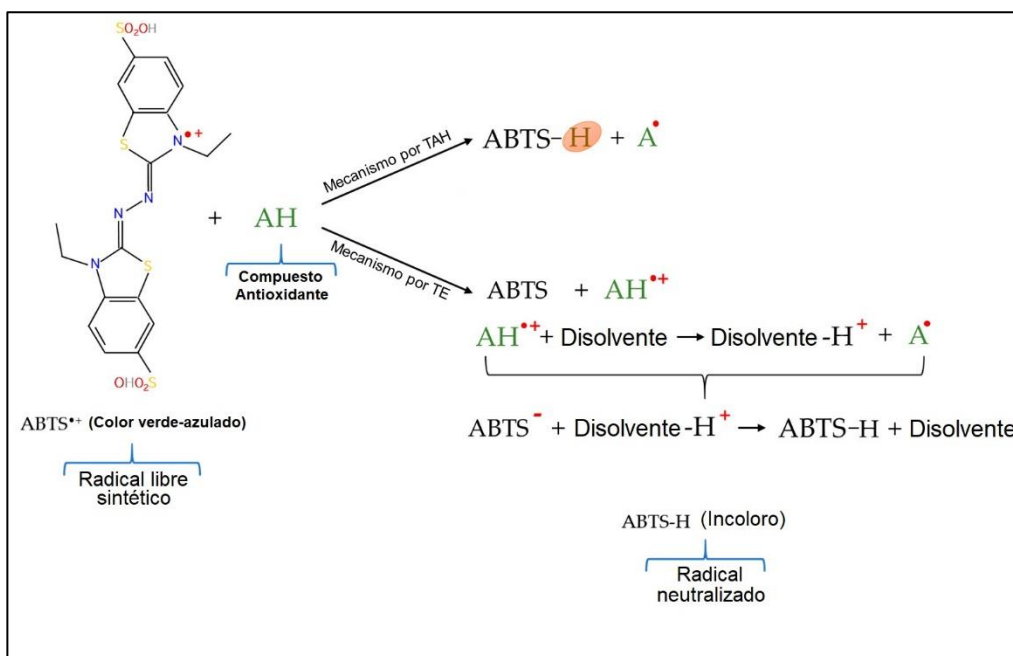


Figura 1.17. Reacción de capacidad antioxidante por el método ABTS. Imagen modificada de Noemí Echegaray en 2021<sup>52</sup>.

### 1.3 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR MÉTODOS DE FLUJO

Una de las principales ventajas aportadas por los métodos basados en flujo para la evaluación antioxidante, es la disminución significativa en el tiempo de análisis. Esto se logra de diferentes maneras, dependiendo de los objetivos para los cuales se desarrolla la aplicación. Para estos métodos, el tiempo de análisis puede ser más

corto que el empleado en el procedimiento por lotes, ya que no se espera que la reacción sea completa.

A lo largo de las últimas dos décadas, varios métodos se han propuesto para la evaluación de la capacidad antioxidante empleando métodos de flujo. En 2002 Hiroyuki y colaboradores propusieron el primer método DPPH empleando un sistema FIA, siendo mejorado en 2004 por Miroslav al adaptarlo a un sistema SIA<sup>53,54</sup>. Por otro lado, el ensayo ABTS tuvo su primera adaptación a un sistema FIA en 2003 y más tarde en 2005 a un sistema SIA<sup>55,56</sup>. Finalmente, en 2013 y 2016 se reportaron los únicos ensayos de FRAP y ORAC, adaptados a un método de flujo, más específicamente a un sistema FIA<sup>57,58</sup>.

Teniendo en cuenta que estos métodos se utilizan de forma rutinaria para fines de cribado, su automatización es relevante. Con respecto a esto, la automatización que utiliza métodos basados en la inyección de flujo puede ofrecer varias ventajas, además de la mejora del rendimiento de la muestra, cuando se compara con los métodos por lotes convencionales. Para aplicarlo, las características de los sistemas de análisis de inyección de flujo (FIA) controlan las condiciones de reacción en el espacio y en el tiempo, esenciales para determinar especies sensibles a las condiciones ambientales (luz, temperatura, presencia de O<sub>2</sub>). Además, la evolución de FIA al análisis de inyección secuencial (SIA), se describe como una alternativa con mayores ventajas con respecto al FIA y a otros métodos de flujo, expandiendo los beneficios de la automatización.

## CAPÍTULO II

### Determinación de capacidad antioxidante por SIA, usando los ensayos ORAC y FRAP

#### 2.1 RESUMEN

En este capítulo, se desarrollaron dos nuevos métodos SIA para determinar la capacidad antioxidante mediante los ensayos ORAC y FRAP utilizando detección fluorimétrica y espectrofotométrica, respectivamente. Ambos métodos por SIA fueron desarrollados de manera independiente, para después conjuntarlos con otros ensayos de capacidad antioxidante y poder desarrollar una metodología que determinara capacidad antioxidante empleando más de un ensayo en una misma configuración SIA.

El método ORAC por SIA destacó notablemente debido a que fue posible disminuir un tiempo de análisis de 90 min por el método de referencia a 5 min y también la concentración del reactivo AAPH a una tercera parte, debido a que se proporcionó más energía a la reacción definida por el ensayo ORAC a través del incremento de la temperatura del ensayo. En adición, fue posible eliminar el paso de integrar áreas bajo la curva de las señales analíticas (picos), que son aplicadas en los métodos en lote, debido a que la altura máxima de los picos fue directamente proporcional a la concentración del estándar ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (trolox), o antioxidantes de la muestra, para determinar la capacidad antioxidante, facilitando de esta manera el tratamiento de datos sin afectar los resultados.

Para el método FRAP por SIA, un ensayo ampliamente descrito y reproducido en diversos trabajos, se evaluó la estabilidad del reactivo FRAP, formado por 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), a diferentes valores de pH, ya que el reactivo que se utiliza en los métodos en lote es inestable, produciéndose un precipitado en menos de una hora de preparado, lo que desencadena en una serie de errores asociados a la precisión del método. Por tanto, se decidió mejorar la estabilidad del reactivo de FRAP hasta alcanzar un tiempo de uso del reactivo sin precipitar de hasta un día completo. En adición, el método mostró una disminución del 20 % de la concentración del reactivo de FRAP y un tiempo de análisis de 30 min (método de referencia) a 1.2 min, con mediciones de altura máxima de pico para la determinación de capacidad antioxidante.



La optimización de ambos métodos se llevó a cabo mediante el diseño de experimentos de cribado y de superficie de respuesta. Las capacidades antioxidantes se estimaron a partir de la altura máxima del pico SIA para ambos métodos, asociando que a mayor altura de pico mayor capacidad antioxidante.

Ambos métodos mostraron una excelente precisión ( $DER < 3 \%$ ), límites de detección menores o iguales a  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , y recuperaciones que oscilan entre 90 y 114 % al analizar muestras de vinos, jugos y extractos de café. Los resultados de los métodos SIA no mostraron una diferencia significativa con respecto a los métodos de referencia.

## 2.2 OBJETIVOS

### GENERAL

Diseñar, desarrollar, optimizar y validar dos sistemas independientes de análisis por inyección secuencial (SIA), de los ensayos de capacidad de absorción de radicales oxígenos (ORAC) y poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) con detección fluorimétrica y espectrofotométrica, respectivamente, y aplicarlos en matrices alimenticias.

### ESPECÍFICOS

- Diseñar configuraciones SIA para los ensayos ORAC y FRAP para determinar capacidad antioxidante con detección fluorimétrica y espectrofotométrica, respectivamente.
- Establecer los parámetros químicos (concentraciones de reactivos involucrados, tiempo de reacción y temperatura) e hidrodinámicos (caudal, volumen, orden de aspirado de muestra y reactivos) que intervienen en los sistemas ORAC-SIA y FRAP-SIA.
- Emplear diseños de experimento de cribado y de superficie de respuesta, para optimizar los parámetros químicos e hidrodinámicos de los métodos ORAC-SIA y FRAP-SIA.
- Determinar los parámetros estadísticos y de validación de ORAC-SIA y FRAP-SIA, tales como el intervalo lineal, límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud.
- Comparar los resultados analíticos de los métodos propuestos con los métodos de referencia por microplaca.
- Cuantificar la capacidad antioxidante de diversas muestras alimenticias entre los métodos ORAC-SIA y FRAP-SIA desarrollados, y los métodos de referencia por microplaca.

### 2.3 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los antioxidantes presentes en los alimentos han adquirido una gran relevancia, ya se ha demostrado que pueden prevenir o equilibrar el daño celular causado por el estrés oxidativo. Estos estudios han llevado a avances en la ciencia de los alimentos, la nutrición y la biología molecular y celular<sup>25-27</sup>.

Dado que los antioxidantes pueden prevenir o retrasar el daño oxidativo celular causado por oxidantes como las ROS y RNS, entonces, es importante saber que la formación de estas especies puede ocurrir en las células a través de reacciones enzimáticas, como el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que se genera mediante enzimas como la NADPH oxidasa y participa en varias reacciones que producen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ )<sup>59</sup>. Las ROS/RNS también pueden generarse a partir de fuentes endógenas (activación de células inmunitarias, inflamación, estrés mental, ejercicio excesivo, isquemia, infecciones y cáncer) o exógenas (contaminación del aire y agua, humo de cigarrillo, alcohol, metales pesados, ciertos medicamentos, disolventes industriales y radiación). La sobreproducción de ROS/RNS genera un fenómeno llamado "estrés oxidativo", que puede alterar seriamente las membranas celulares y otras estructuras como proteínas, lípidos, lipoproteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN), causando patologías como: cáncer, nefropatía, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, pulmonares y oculares<sup>31-34</sup>.

El estrés oxidativo puede contrarrestarse neutralizando estas ROS/RNS con antioxidantes endógenos (generadas naturalmente *in situ*) o exógenos (suministrados externamente a través de la dieta alimenticia). Los antioxidantes endógenos pueden encontrarse en enzimas o compuestos producidos por el metabolismo en el cuerpo, mientras que los antioxidantes exógenos pueden encontrarse en algunas vitaminas como la E y la C, los carotenoides y los flavonoides, que se consumen a través de alimentos o suplementos<sup>25</sup>.

La ingesta de antioxidantes en la dieta puede ayudar a mantener un estado antioxidante adecuado y, por lo tanto, la función fisiológica normal de un sistema vivo<sup>60,61</sup>. Aunque los antioxidantes son reconocidos como fitonutrientes significativos, actualmente no existe un índice de nutrientes de "antioxidantes totales" disponible para el etiquetado de alimentos debido a la falta de métodos de

cuantificación estándar. A diferencia de otros nutrientes, la diversidad química de los antioxidantes hace que sea laborioso separar y cuantificar antioxidantes individuales de una matriz con diversos compuestos como los extractos de plantas, y es por lo que se establecen métodos que puedan medir directamente la actividad antioxidante total en muestras de alimentos.

Entre los ensayos más representativos se encuentran: el ensayo FRAP<sup>48,62</sup>, el ensayo ABTS<sup>63,64</sup>, el ensayo DPPH<sup>65,66</sup> y el ensayo ORAC<sup>41,43</sup>. Desde un punto de vista químico, estos métodos se basan en una reacción de TE o TAH entre un oxidante y un radical libre. Para los métodos basados en TE como FRAP y ABTS, los antioxidantes se oxidan mediante oxidantes como Fe (III) o ABTS<sup>+</sup>, mientras que en un método basado en TAH como ORAC, se utiliza un iniciador de radicales para generar radicales peroxilo (ROO<sup>•</sup>)<sup>67</sup>. El ROO<sup>•</sup> extrae preferentemente un átomo de hidrógeno del antioxidante y como resultado la reacción entre ROO<sup>•</sup> y la sonda de la molécula objetivo se retrasa o se inhibe. Dado que estos métodos son químicamente diferentes y se basan en varios mecanismos de reacción, es necesario evaluar la capacidad antioxidante de una muestra utilizando ambos métodos y, así, proporcionar valores antioxidantes comparables.

El ensayo ORAC es uno de los más utilizados para determinar la capacidad antioxidante en diversas muestras, debido a la similitud que tiene con el mecanismo de la degradación oxidativa de los lípidos<sup>64,68-70</sup>. Dicho ensayo se basa en una reacción cinética competitiva que involucra: un generador de radicales libres, una sonda molecular oxidativa y un antioxidante. De esta manera se mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína después de mezclarla con un generador de radicales libres como el AAPH. La intensidad fluorescente se mide cada minuto durante 90 min en condiciones de pH 7.4 y 37 °C. A medida que avanza la reacción, la intensidad fluorescente de la fluoresceína decae, por otra parte, cuando se añade un compuesto antioxidante se inhibe la disminución de la intensidad fluorescente. En consecuencia, el procesamiento de datos del ensayo ORAC se logra calculando el área bajo la curva cinética (AUC por sus siglas en inglés) y el AUC neta (AUC de muestra – AUC de blanco), para así obtener una curva de calibración de concentración del estándar antioxidante vs el AUC y, de esta manera, calcular la capacidad antioxidante de una muestra en función de la concentración del estándar empleado<sup>71</sup>.

En 2002 Huang y colaboradores<sup>72</sup> desarrollaron y validaron un ensayo ORAC utilizando fluoresceína como reactivo fluorescente y lo adaptaron a un formato de lector de placa de 96 pozos, analizando diversas muestras. A pesar de las mejoras en el método ORAC, aún se han identificado dificultades y limitaciones, como el tiempo de retardo entre pozos que produce un error sistemático, provocando diferencias estadísticamente significativas en la determinación de la capacidad antioxidante de estándares o muestras, dependiendo de la posición de dispensado en la microplaca<sup>73</sup>. También existen modificaciones al método ORAC original, utilizando rojo de pirogalol como agente oxidante y un espectrofotómetro como detector<sup>74</sup>. Sin embargo, se sabe que los detectores fluorimétricos proporcionan una mayor sensibilidad en comparación con los espectrofotométricos.

En 2016 Ramos y colaboradores<sup>58</sup> propusieron un sistema FIA para cuantificar la capacidad antioxidante mediante el método ORAC utilizando rojo de pirogalol como sonda oxidativa y detección UV/Vis. Este método fue novedoso y aunque contó con una tasa de muestreo de 29 muestras por hora, presentó menor sensibilidad ( $0.31 \pm 0.02$ ) en comparación con el método estándar por microplaca.

El ensayo FRAP es otro método para determinar capacidad antioxidante, que inicialmente fue implementado para medir el poder antioxidante del plasma sanguíneo<sup>48</sup>. Este ensayo emplea un complejo férrico de tripiridiltriazina ( $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ ) que es reducido a la forma ferrosa (II), y debido a que la estructura de este complejo se asemeja al grupo hemo presente en el plasma sanguíneo, se pudo considerar un método de capacidad antioxidante con mecanismo de reacción similar al que sufre la hemoglobina cuando sufre un proceso de estrés oxidativo<sup>75</sup>. El ensayo FRAP ha sido empleado en diversos estudios a lo largo del tiempo como: evaluar la biodisponibilidad de antioxidantes<sup>76</sup>; analizar muestras de fluidos biológicos como suero, orina o saliva<sup>77</sup>; y medir la absorción de antioxidantes después de la ingestión de alimentos y bebidas<sup>78</sup>. Sin embargo, este ensayo es considerado con mayor flexibilidad en términos del medio de reacción entre la muestra y el reactivo, a diferencia de los otros ensayos de capacidad antioxidante, puesto que el complejo férrico puede ser preparado en medio acuoso u orgánico (metanol/etanol), permitiendo analizar muestras extraídas en cualquiera de estos medios mencionados<sup>79</sup>. En adición, actualmente el ensayo se ha caracterizado por su bajo costo y alta sensibilidad, rapidez y sencillez de realizar, lo que ha dado la

pauta para generar una base de datos muy sólida del contenido total de antioxidantes de una amplia variedad de alimentos, como lo publicado en 2014 por Benzie<sup>78</sup>.

El fundamento del ensayo FRAP se basa en la reducción del complejo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  en presencia de un antioxidante, dando lugar a una coloración azul medible en unidades de absorbancia mediante un espectrofotómetro a 593 nm. El formato por microplaca del ensayo FRAP fue introducido recientemente en 2005 por Firuzi y colaboradores<sup>80</sup> y 10 años después fue optimizado por Bolanos y colaboradores<sup>81</sup>, lo que mejoró el rendimiento de las muestras en comparación con los ensayos manuales<sup>82,83</sup>. Sin embargo, la longitud del paso óptico para los lectores de microplacas no siempre es la misma, y los resultados pueden verse afectados por cambios en el volumen y la composición de la muestra<sup>84,85</sup>. La mayoría de los lectores de microplacas necesitan la función de corrección automática de la longitud del camino fotométrico. La dependencia de la longitud del paso óptico del volumen de la muestra hace que los resultados de los métodos por microplacas sean menos comparables entre diferentes laboratorios.

En este capítulo se escribe el diseño, la optimización y la validación de los métodos ORAC y FRAP usando la técnica de SIA. Ambos métodos fueron desarrollados con la finalidad de reducir los tiempos prolongados de reacción de cada ensayo, minimizar los volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados, incrementar la precisión de los ensayos, y finalmente, contar con una alta frecuencia de muestreo. Los métodos SIA se diseñaron basados en los métodos por microplaca de referencia, y se optimizaron los parámetros fisicoquímicos e hidrodinámicos utilizando diseños de experimento de cribado y de superficie de respuesta. La calidad de los datos, como el intervalo lineal, LD (límite de detección), LC (límite de cuantificación), precisión y recuperaciones, se calcularon siguiendo los procedimientos de validación de normas internacionales. La correlación de la capacidad antioxidante entre los métodos SIA y los métodos por microplaca fue evaluada utilizando el estándar de trolox. Finalmente, se compararon los resultados del análisis de diferentes muestras de alimentos, con los obtenidos por los métodos por microplaca de cada ensayo.

## 2.4 METODOLOGÍA

A continuación, se describen los reactivos, disoluciones y equipo utilizado para ambas determinaciones.

### 2.4.1 Reactivos y disoluciones

Para el ensayo ORAC se utilizó: fluoresceína, diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (AAPH), vainillina; y para el ensayo FRAP: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), cloruro de férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato de sodio dibásico heptahidratado ( $\text{HNa}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y fosfato de potasio monobásico ( $\text{H}_2\text{KPO}_4$ ), todos de Sigma-Aldrich. El ácido clorhídrico (HCl) y el ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) empleados para el ensayo FRAP se obtuvieron de J.T. Baker. Para ambos métodos se utilizó ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (trolox) como estándar antioxidante.

Se prepararon disoluciones madre de fluoresceína  $0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  y trolox  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ , y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad. A partir de las disoluciones madre de trolox, se prepararon diariamente disoluciones estándar para construir las curvas de calibración para los ensayos ORAC y FRAP.

#### Ensayo ORAC

Se preparó una disolución tampón de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés)  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7 y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  durante un máximo de 15 días. Además, se utilizó una disolución de trabajo de AAPH  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  en PBS preparada diariamente.

#### Ensayo FRAP

La disolución de trabajo de FRAP se preparó diariamente mezclando 12.5 volúmenes de HCl ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ) con 1 volumen de TPTZ ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$  disueltos con HCl  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ) y 1 volumen de cloruro férrico ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$  en agua).

### 2.4.2 Muestras

Para el ensayo ORAC, por el método SIA y microplaca, las muestras analizadas fueron néctar de arándano, néctar de uva, jugo de uva y arándano, néctar de manzana arándano, vino tinto carmenere y vino tinto merlot, granos de café (miel y

café lavado), y vainilla en polvo (Vailicap®) comprados en supermercados locales de la Ciudad de México.

Los extractos de vainilla se obtuvieron mediante el uso de un horno de microondas focalizado Maxidigest MX 350 siguiendo lo reportado en nuestro grupo de trabajo<sup>86</sup>. Se colocó 1 g de polvo de vainilla en 25 mL de una solución de etanol/agua al 70 % y luego se aplicó a la muestra una potencia de irradiación de microondas de 150 W. Se realizaron 20 ciclos de 1 min de irradiación y 3 min de no irradiación. Después de la extracción, los extractos fueron filtrados y recolectados. Para los extractos de café; primero se pesaron 0.9 g de café molido y se dejaron en 20 mL de agua destilada a 87 °C en agitación magnética durante 5 min; luego se filtró y recolectó el extracto. Todas las muestras se diluyeron en agua destilada.

Para el ensayo FRAP, tanto por el método SIA como por microplaca, se analizaron muestras de jugos procesados y embotellados en plástico (arándano, uva, uva-arándano), vinos tintos (carmenere y merlot), granos de café lavado, té verde y tomates comprados en supermercados locales de la Ciudad de México. Todas las muestras se diluyeron en agua destilada. Los extractos de café lavado y té verde se obtuvieron pesando 0.9 g de muestra molida y adicionando 20 mL de agua destilada a una temperatura de 87 °C en agitación magnética durante 5 minutos; más tarde se filtró y colectó lo obtenido en la extracción.

Los extractos de tomate rojo se obtuvieron pesando 1 g de tomate seco y adicionando 20 mL de una disolución de etanol/agua al 55 %, y luego se aplicó a la muestra irradiación por ultrasonido-asistido a una potencia del 40 %. Se realizaron cinco ciclos de 10 segundos de irradiación y 30 segundos de no irradiación. Después de la extracción, los extractos fueron filtrados y colectados.

#### **2.4.3 Instrumentos y equipos**

Se utilizó un equipo FIALab SIChrom integrado con una válvula multiposición de 8 puertos, con la cual fueron aspiradas e impulsadas las muestras y reactivos de cada método desarrollado por SIA.

El equipo SIA incorporó un bucle de espera de polímero PEEK (0.70 mm de D.I.) con un volumen de 1 mL y un reservorio de 4 mL para el llenado de la disolución portadora. Se utilizaron tuberías de teflón con un diámetro interno de 0.70 mm (para muestra, portador, residuos y salida al detector).



La programación de la inyección secuencial para los métodos propuestos se logró mediante el control computarizado del equipo FIALab SICrom, utilizando el software FIALab para Windows versión 5.0.

El sistema de detección para el método ORAC constó de un fluorímetro de tubo fotomultiplicador FIALab (PMT-FL) equipado con filtros de emisión y excitación ( $\lambda_{ex}=486$  nm y  $\lambda_{em}=500$  nm) y una celda de flujo Hellma de 10 mm de paso óptico. Para el método FRAP se usaron dos fibras ópticas de 400  $\mu$ m, una celda de flujo Z (10 mm de paso óptico), una fuente de luz UV-Vis-NIR y un detector UV-Vis USB4000 de la marca Ocean Optics ajustado a 593 nm.

Todas las disoluciones y muestras fueron desgasificadas a través de un Baño de ultrasonido de la marca Bransonic.

Para las muestras sólidas se hicieron las extracciones por agitación magnética con temperatura controlada usando una parrilla de la marca CIMAREC.

Para los métodos de capacidad antioxidante por microplacas, se utilizó un lector de microplaca Biotek Synergy HT de un solo canal, integrado con una lámpara de xenón, un monocromador y control de temperatura. El análisis fue controlado por computadora utilizando el software Gen5 de BioTek.

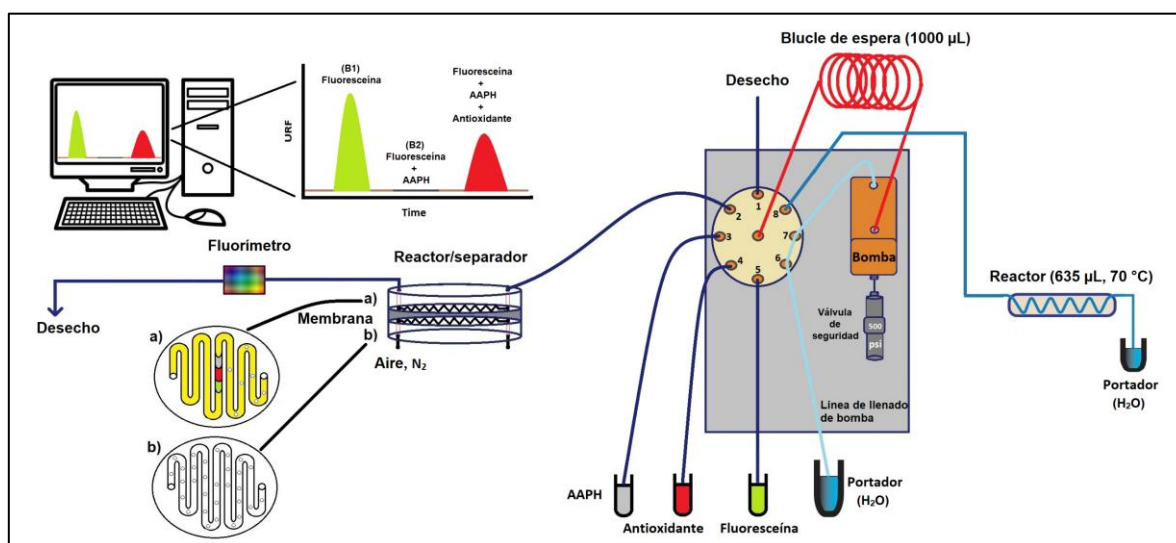
#### **2.4.4. Método ORAC por SIA**

##### **2.4.4.1 Procedimiento del método**

En el ensayo ORAC la capacidad antioxidante de la muestra o estándar depende de la intensidad fluorescente de la fluoresceína, la cual disminuye debido a la oxidación que sufre al reaccionar con los radicales peroxilo que se forman a partir del reactivo AAPH (**figura 1.14**). Cuando hay un compuesto antioxidante, la disminución de la señal de fluorescencia es mayor o menor dependiendo del poder del antioxidante. Por lo tanto, el método ORAC-SIA constó de dos pasos de medición: 1) la disminución de la intensidad de fluoresceína por reacción con AAPH, y 2) protección de la intensidad de fluoresceína por la presencia de un antioxidante. El método propuesto requirió de un reactor de tubería de teflón (0.7 mm de D.I.) con un volumen de 635  $\mu$ L e inmerso en un baño maría Thermo Scientific serie 280. También se utilizó un filtro de membrana de polipropileno Whatman (47 mm de diámetro y 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro), colocado dentro de una celda de extracción

de flujo de acero inoxidable, para eliminar el nitrógeno gaseoso liberado por el reactivo AAPH durante la formación de radicales peroxilo.

La **figura 2.1** muestra la configuración del método SIA para determinar capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC, y la **tabla 2.1** muestra los pasos de la programación de dicho método. Inicialmente, se llenó la bomba de jeringa con el portador de agua destilada (paso 1); luego, se aspiraron secuencialmente AAPH, fluoresceína y la muestra de antioxidante hacia el bucle de espera (pasos 2 a 4). El bolo formado en el bucle de espera se dispensó hacia el reactor sumergido en un baño maría a 70 °C (paso 5) para llevar a cabo la reacción de oxidación/protección. Posteriormente, se aspiraron 400  $\mu\text{L}$  del contenido en el reactor hacia el bucle de espera (paso 6). Finalmente, todo el volumen contenido en el bucle de espera se dispensó hacia el detector, pasando por una celda de difusión donde a través de una membrana de polipropileno (paso 7) se eliminó el nitrógeno gaseoso formado durante la reacción del radical peroxilo. La señal de fluoresceína se midió utilizando filtros de emisión y excitación a 486 nm y 500 nm, respectivamente.



**Figura 2.1.** Sistema SIA para cuantificar capacidad antioxidante a través del ensayo ORAC

**Tabla 2.1.** Programación del sistema SIA para evaluar la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC, empleando la configuración de la figura 2.1

| Paso | Acción   | Puerto de válvula | Descripción                                       | Caudal <sup>a</sup> | Dirección de flujo | Tiempo (s) |
|------|--|-------------------|---|---------------------|--------------------|------------|
| 1    | Llenado de bomba                                   | 6                 | La bomba es llenada con 3.5 mL de agua            | 50                  | Inverso            | 70         |
| 2    | Aspirado de AAPH 0.05 μmol L <sup>-1</sup>         | 3                 | Se aspira 10 μL de AAPH al holding coil           | 10                  | Inverso            | 1          |
| 3    | Aspirado de antioxidante                           | 4                 | Se aspira 10 μL de Antioxidante al holding coil   | 10                  | Inverso            | 1          |
| 4    | Aspirado de fluoresceína 2.25 μmol L <sup>-1</sup> | 5                 | Se aspira 10 μL de fluoresceína al holding coil   | 10                  | Inverso            | 1          |
| 5    | Dispensado al reactor                              | 8                 | Se dispensa 400 μL del holding coil al reactor    | 20                  | Hacia delante      | 20         |
| 6    | Aspirado al holding coil                           | 8                 | Se aspira 600 μL del reactor al holding coil      | 20                  | Inverso            | 30         |
| 7    | Dispensado al detector                             | 2                 | Se dispensa 3 730 μL del holding coil al detector | 20                  | Hacia delante      | 186.5      |

<sup>a</sup> Caudal en μL s<sup>-1</sup>.

#### 2.4.4.2 Determinación de capacidad antioxidante

Para cuantificar la capacidad antioxidante primero se midió la intensidad máxima del pico SIA (señal analítica) de la fluoresceína cuando se aspiró el estándar/muestra junto con fluoresceína y AAPH, y posteriormente se transformó a porcentajes de protección utilizando dos blancos de referencia: señal de fluoresceína sin AAPH (B1) y señal de fluoresceína con AAPH (B2). El valor del porcentaje de protección (PP) se definió como el grado de protección de la intensidad de fluoresceína con AAPH al aspirar una concentración definida de antioxidante utilizando la expresión matemática:

$$PP = \frac{I_S - I_{B2}}{I_{B1} - I_{B2}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde  $I_S$  representa la intensidad de la señal después de la reacción entre la muestra, AAPH y fluoresceína;  $I_{B1}$  e  $I_{B2}$  corresponden a las intensidades de las señales del blanco de fluoresceína sin y con AAPH, respectivamente. Para calcular el porcentaje de reacción (PR), el porcentaje de protección calculado (PP) se restó al 100 %.

#### 2.4.4.3 Determinación del coeficiente de dispersión.

Antes de iniciar la optimización del método ORAC-SIA, se realizó un primer análisis aspirando secuencialmente 10  $\mu\text{L}$  de cada reactivo (agua, PBS y fluoresceína) a un caudal de 20  $\mu\text{L s}^{-1}$  para calcular el coeficiente de dispersión de Ruzicka<sup>87</sup>. Este parámetro estableció la mejor concentración y el volumen de aspiración de fluoresceína para una intensidad (pico) fluorescente detectable y sin saturación de la señal analítica.

Inicialmente se midió la intensidad fluorescente por lote de disoluciones de fluoresceína a concentraciones desde 0.3 hasta 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , utilizando una celda de flujo de 10 mm de paso óptico acoplada a un fluorímetro con filtros de excitación y emisión a 486 y 500 nm, respectivamente. Después se graficaron las unidades de fluorescencia (URF) frente a las concentraciones de fluoresceína y se estimó la ecuación de la recta. Posteriormente, empleando la configuración SIA, se aspiró una disolución de fluoresceína a 12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , siguiendo los mismos pasos que en la Tabla 2.1 pero sin reactivos, y se midió la fluorescencia a través de la misma celda de flujo acoplada al fluorímetro. El cálculo del coeficiente de dispersión se realizó interpolando la intensidad fluorescente del sistema SIA en la ecuación de la recta del gráfico por lote.

#### 2.4.4.4 Evaluación de la reacción entre fluoresceína y AAPH.

Uno de los parámetros más relevantes en el método ORAC es la reacción cinética entre el AAPH y la fluoresceína y cómo un compuesto antioxidante retrasa la reacción exhaustiva entre ambos. Por tanto, se estudiaron diferentes concentraciones de fluoresceína y AAPH para obtener las mejores condiciones de una reacción exhaustiva.

Aunque el equipo SIA permitía aspirar volúmenes por debajo de 5  $\mu\text{L}$ , se decidió comenzar con 10  $\mu\text{L}$  para no afectar la precisión del método por errores de aspirado de volumen. En primera instancia, se evaluaron concentraciones de AAPH de 0.01 a 0.15  $\text{mol L}^{-1}$  aspirando volúmenes de 10 a 30  $\mu\text{L}$  y concentraciones de fluoresceína de 1.8 y 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (10  $\mu\text{L}$  de volumen de aspiración). Las temperaturas evaluadas fueron de 37 a 70  $^{\circ}\text{C}$  para reacciones llevadas a cabo deteniendo el flujo por 30 s en el reactor. La secuencia de aspiración utilizada para estas pruebas fue agua-AAPH-fluoresceína a un caudal de 20  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

#### 2.4.4.5 Optimización del método ORAC-SIA.

El método ORAC-SIA se optimizó mediante diseños de experimentos con la finalidad de maximizar el PP y el PR. Para reducir el número de experimentos y no realizar un solo diseño que involucrará cada uno de los factores evaluados, se decidió dividir la optimización en dos diseños. Los parámetros químicos como las concentraciones de los reactivos fueron evaluados mediante un diseño de superficie de respuesta y los parámetros hidrodinámicos (caudal y volumen de aspirado) se evaluaron con un diseño de cribado.

Desde este punto hasta la validación del método ORAC-SIA se decidió emplear como estándar antioxidante vainillina, debido a que es un estándar económico y que brinda una capacidad antioxidante similar al estándar de trolox (empleado como referencia en la mayoría de los ensayos de capacidad antioxidante).

##### ***Determinación de la secuencia de aspirado***

En un sistema SIA los reactivos y las muestras se aspiran secuencialmente, y la secuencia depende de la respuesta analítica esperada, siendo crucial para la reacción entre ellos. La reacción química también depende de la difusión de cada zona aspirada. Por tanto, la zona de difusión de la fluoresceína debe ser adecuada para la reacción entre el AAPH y el antioxidante.

Para evaluar la secuencia de aspirado se propusieron las siguientes secuencias: 1) antioxidante-AAPH-fluoresceína; 2) antioxidante-fluoresceína-AAPH; 3) fluoresceína-AAPH-antioxidante; 4) fluoresceína-antioxidante-AAPH; 5) AAPH-fluoresceína-antioxidante y 6) AAPH-antioxidante-fluoresceína, utilizando estándares de vainillina a 25 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  como antioxidante y agua destilada para la señal en blanco. El mayor porcentaje de protección (PP) determinó la mejor secuencia de aspiración.

Para estos experimentos se utilizó un volumen de aspirado de 10  $\mu\text{L}$  para cada disolución, disoluciones de AAPH a 0.05  $\text{mol L}^{-1}$  y fluoresceína a 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , una temperatura de reacción de 70  $^{\circ}\text{C}$ , un caudal de 20  $\mu\text{L s}^{-1}$  y un tiempo de reacción de 30 s parando el flujo en el reactor.

##### ***Parámetros químicos: concentraciones de los reactivos AAPH y fluoresceína***

Se construyó un diseño compuesto central (DCC) en 2 bloques con 3 puntos centrales por bloque con un total de 14 experimentos para optimizar la reacción entre fluoresceína y AAPH del ensayo ORAC y así obtener los valores más altos del

PP y PR. Las concentraciones a nivel bajo y alto fueron 0.05 y 0.1 mol L<sup>-1</sup> para AAPH, y 1.5 y 3 μmol L<sup>-1</sup> para fluoresceína. Las variables de respuesta fueron el PP utilizando vainillina a 25 y 100 μmol L<sup>-1</sup> como estándar antioxidante. Los experimentos se fijaron con un volumen de aspirado de 10 μL por cada disolución, una temperatura de reacción de 70 °C, un caudal de 20 μL s<sup>-1</sup>, una secuencia de aspirado (AAPH-antioxidante-fluoresceína) y 30 s parando el flujo en el reactor.

#### ***Parámetros hidrodinámicos: caudal y volumen de aspirado***

La evaluación del caudal y volumen de aspirado fue mediante un diseño factorial completo (DFC) 2<sup>2</sup> con una réplica, obteniendo 8 experimentos. Se fijaron concentraciones de 0.05 mol L<sup>-1</sup> para AAPH, 2.25 μmol L<sup>-1</sup> para fluoresceína y 25 μmol L<sup>-1</sup> para vainillina. Los volúmenes de reactivos y muestra fueron un solo factor, así, los valores máximo y mínimo fueron 5 y 10 μL. Para los caudales se utilizaron niveles bajos y altos de 5 y 20 μL s<sup>-1</sup>. Las variables de respuesta para estos experimentos fueron PR y PP. Los parámetros fijos fueron una temperatura de reacción de 70 °C, una secuencia de aspiración (AAPH-antioxidante-fluoresceína) y un tiempo de reacción de 30 s parando el flujo en el reactor.

#### ***Tiempo de reacción***

En los métodos por lotes y microplaca de ORAC, la intensidad de la fluorescencia se mide cada minuto durante 90 min, respectivamente. A medida que avanza la reacción, la fluoresceína se consume y su intensidad disminuye. Con base en este principio de reacción, se decidió evaluar los tiempos de espera parando el flujo cuando los reactivos (fluoresceína y AAPH) llegan al reactor.

Los tiempos de reacción deteniendo el flujo en el reactor fueron de 30, 20, 10 y 0 s, y la variable de respuesta fue PR entre reactivos. Las concentraciones de fluoresceína y AAPH utilizadas fueron de 2.25 y 0.05 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, y un caudal de 20 μL s<sup>-1</sup>. Se fijó un volumen de aspirado de 10 μL para cada reactivo, una temperatura de reacción de 70 °C y la secuencia de aspirado de AAPH-agua destilada-fluoresceína.

#### 2.4.4.6 Parámetros estadísticos y de validación

Una vez seleccionadas las mejores condiciones hidrodinámicas y químicas del método, se calcularon parámetros como intervalo lineal de la curva de calibración, límite de detección y cuantificación, precisión, recuperaciones y correlación con los métodos de referencia. Para todos los experimentos se utilizó el estándar de trolox como antioxidante, reportando de esta manera resultados de la capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalente de trolox.

##### **Curva de calibración**

El análisis de datos se realizó calculando el PP y obteniendo una curva de calibración graficando la concentración del estándar trolox vs el PP. Se construyeron curvas de calibración durante siete días utilizando concentraciones de trolox en un intervalo de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y graficando contra el PP. Finalmente, se construyó una curva de calibración promedio, estableciendo el error en pendiente e intersección. Los límites de detección y cuantificación se estimaron considerando la desviación estándar de la regresión lineal ( $S_{y/x}$ ) y la pendiente ( $b$ ) de la curva de calibración promedio<sup>88</sup>.

##### **Método ORAC por microplaca**

El lector de microplacas se configuró en modo de detección de fluorescencia empleando filtros de excitación y emisión a 485 y 528 nm, respectivamente, y se fijó a temperatura de 37 °C. Para cada microplaca de 96 pocillos se estableció una zona de trabajo de 60 pocillos para medir la intensidad fluorescente. El procedimiento se realizó acorde con lo reportado por Huang y colaboradores<sup>41</sup>. En cada micropozo se dispuso un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción (150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína 0.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 25  $\mu\text{L}$  de la muestra o estándar y 25  $\mu\text{L}$  de AAPH 0.153 mol  $\text{L}^{-1}$ ) y se colocó la microplaca en el equipo con un tiempo de análisis de 90 min a 37 °C (**figura A2.1 de los anexos**). Una disolución de PBS de 0.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a pH 7 reemplazó las muestras o estándares trolox y la disolución de AAPH para los blancos de reacción.

Los análisis de datos se realizaron calculando el AUC de dos blancos (B1 y B2) y el AUC de la muestra/estándar según el método de los trapecios. Así, se pudo determinar el PP usando la ecuación 2.2. Se construyó una curva de calibración graficando la concentración del estándar trolox (10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) contra el PP. Los

resultados de capacidad antioxidante se expresaron en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalentes de trolox.

$$PP = \frac{AUC_s - AUC_{B2}}{AUC_{B1} - AUC_{B2}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

### ***Recuperaciones***

Se calcularon los porcentajes de recuperación a partir de cuatro muestras analizadas previamente. Las muestras fueron: jugo de arándano al 0.66 %, vino tinto carmenere al 0.05 %, extracto de vainilla al 0.05 % y extracto de café al 0.06 %. En primer lugar, se midió la capacidad antioxidante de las muestras por triplicado, y posteriormente se fortificaron las muestras con concentraciones de trolox a 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



## 2.4.5 Método FRAP por SIA

### 2.4.5.1 Procedimiento del método

En el ensayo FRAP, la capacidad antioxidante se determina mediante una reacción redox entre el antioxidante y el complejo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  (figura 1.16). Dado que el  $\text{Fe}^{+3}$  se reduce a  $\text{Fe}^{+2}$ , es posible asociar el grado de reacción con la capacidad antioxidante de la muestra. Además, la reacción se puede medir mediante el cambio de color del complejo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  (amarillo) a  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+2}$  (azul) a 593 nm, y obtener valores de absorbancia asociados con la capacidad antioxidante de la muestra. Por esta razón, para realizar el ensayo FRAP fue necesario primero formar el complejo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  y luego añadir la muestra o estándar para determinar la capacidad antioxidante. El complejo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  o reactivo FRAP fue preparado mezclando disoluciones de  $\text{HCl}$   $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{TPTZ}$   $0.010 \text{ mol L}^{-1}$  (disuelto con  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{HCl}$ ) y  $\text{FeCl}_3$   $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  en la proporción 12.5:1:1.

En la tabla 2.2 se describen los pasos de la programación del método FRAP-SIA y en la figura 2.2 se muestra la configuración utilizada. Como primer paso se llenó el reservorio de la bomba del equipo con agua destilada (portador); luego, el reactivo FRAP, la muestra y el portador se aspiraron secuencialmente en el bucle de espera (pasos 2 a 5). Después, se dispensaron  $100 \mu\text{L}$  desde el bucle de espera al detector (paso 6); y finalmente, todo el volumen contenido en el bucle de espera y la bomba se dispensó hacia el detector (paso 7) ajustado a 595 nm.

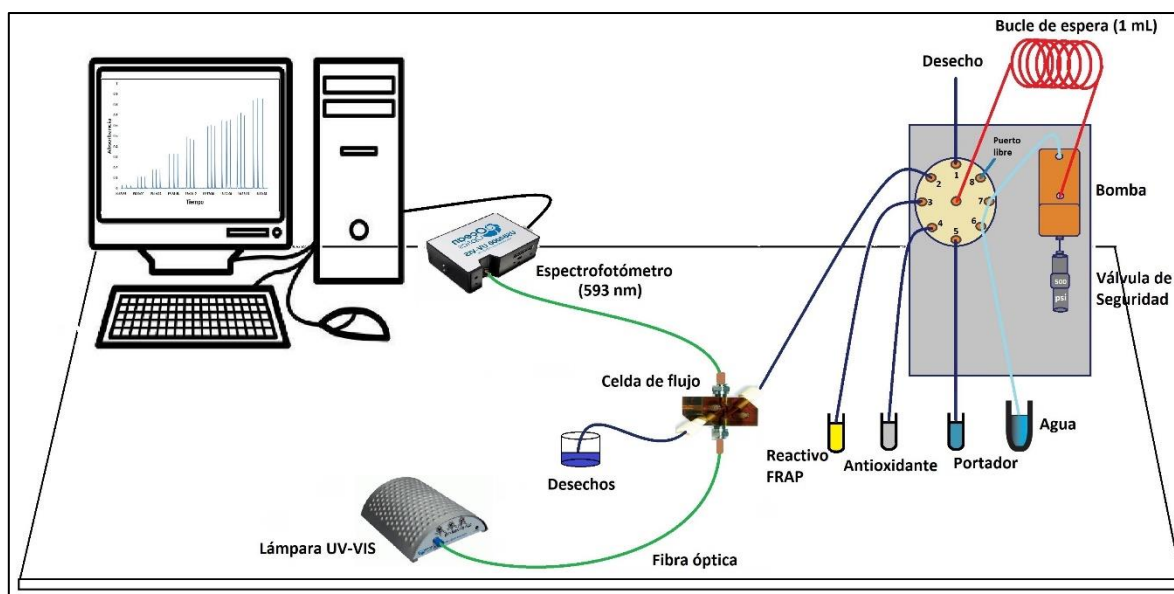


Figura 2.2. Sistema SIA para cuantificar capacidad antioxidante por el ensayo FRAP

**Tabla 2.2.-** Programación del sistema SIA para cuantificar capacidad antioxidante por el ensayo FRAP utilizando la configuración de la figura 2.2

| Paso | Acción                           | Puerto | Descripción  | Caudal (μL/s) | Dirección de flujo | Tiempo (s) |
|------|----------------------------------|--------|--|---------------|--------------------|------------|
| 1    | Llenado de bomba con el portador | 6-7    | La bomba es llenada con 1.5 mL de agua destilada                 | 100           | Inverso            | 15         |
| 2    | Aspirado de disolución FRAP      | 3      | Se aspira 33 μL de disolución FRAP al bucle de espera            | 70            | Inverso            | 0.47       |
| 3    | Aspirado de antioxidante         | 4      | Se aspira 38 μL del antioxidante al bucle de espera              | 70            | Inverso            | 0.54       |
| 4    | Aspirado de disolución FRAP      | 3      | Se aspira 33 μL de disolución FRAP al bucle de espera            | 70            | Inverso            | 0.47       |
| 5    | Aspirado de portador             | 5      | Se aspira 110 μL de agua al bucle de espera con 1 s de espera    | 50            | Inverso            | 3.2        |
| 6    | Dispensado hacia el detector*    | 2      | Se dispensa 100 μL al detector                                   | 20            | Hacia delante      | 5          |
| 7    | Dispensado hacia el detector     | 2      | Se dispensa 1 614 μL del bucle de espera y la bomba, al detector | 35            | Hacia delante      | 46         |

\*Espectrofotómetro configurado a 593 nm.

#### 2.4.5.2 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante por el método FRAP-SIA fue determinada mediante la medición de la absorbancia del complejo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  o reactivo de FRAP antes ( $A_0$ ) y después ( $A_s$ ) de reaccionar con la muestra o estándar. De esta forma, se obtuvo la resta de los valores de absorbancia de  $A_s$  menos  $A_0$  del ensayo FRAP. Esto se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Abs}_{\text{FRAP}} = A_s - A_0 \quad \text{Ec. 2.3}$$

A partir de los valores de  $\text{Abs}_{\text{FRAP}}$  se pudo construir una curva de calibración con un estándar antioxidante graficando las concentraciones utilizadas del estándar contra las  $\text{Abs}_{\text{FRAP}}$  obtenidas. Por lo tanto, para cada muestra analizada, los valores de capacidad antioxidante se reportaron en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalente de trolox.

#### 2.4.5.3 Evaluación de reacción del ensayo FRAP

Usando una programación similar a la descrita en la **tabla 2.2**, se aplicó una secuencia de aspiración antioxidante-FRAP-antioxidante con volúmenes de aspirado de 25-30-25 μL, respectivamente, y un flujo de salida al detector de 20 μL s<sup>-1</sup> para asegurar la reacción entre el reactivo FRAP y un estándar de trolox de 400 μmol L<sup>-1</sup> y se midió el producto de reacción a 593 nm. El aumento de la señal (pico)

obtenido por un aumento de la señal de absorbancia indicó que la reacción de capacidad antioxidante se puede llevar a cabo utilizando el ensayo FRAP en SIA. El reactivo FRAP se preparó según lo propuesto por Thaipong y colaboradores<sup>89</sup> mezclando disoluciones tampón de acetatos 0.3 mol L<sup>-1</sup> (pH 4.7), TPTZ 10 mmol L<sup>-1</sup> y FeCl<sub>3</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup> en una proporción de 10: 1: 1.

#### 2.4.5.4 Estabilidad del reactivo de FRAP

Desde el primer informe del ensayo FRAP en 1996 por Benzie<sup>48</sup> hasta trabajos recientes, la forma de preparar el reactivo FRAP ha sido la misma, ignorando que el reactivo es inestable por más de una hora después de su preparación, presentando un precipitado y provocando una alta variabilidad en las mediciones de capacidad antioxidante, por alteración en la estequiometría de reacción.

Por esta razón, se evaluó la estabilidad del complejo [Fe(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>+3</sup> durante 2 horas para observar cambios físicos en la composición del reactivo FRAP. La medición de la capacidad antioxidante se realizó por el método FRAP-SIA utilizando trolox a 50 μmol L<sup>-1</sup> con 10 repeticiones, para verificar que las mediciones de capacidad antioxidante se mantuvieran constantes (picos reproducibles).

Por lo tanto, se propusieron cinco nuevas formas de preparar el reactivo FRAP (**tabla 2.3**). Estos experimentos fueron monitoreados en oscuridad y luz, utilizando botellas ámbar y transparentes para el almacenamiento.

**Tabla 2.3.** Combinaciones de diferentes mezclas mejorar la estabilidad de la disolución FRAP

| Experimento | Disoluciones de mezcla                            |                   |                                | Proporción |
|-------------|---|-------------------|--------------------------------|------------|
| Mezcla 1    | Buffer acetatos<br>0.3 mol L <sup>-1</sup> pH 4.7 | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (20:1:1)   |
| Mezcla 2    | Buffer fosfatos<br>0.3 mol L <sup>-1</sup> pH 2   | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (10:1:1)   |
| Mezcla 3    | HCl 0.04 mol L <sup>-1</sup>                      | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (10:1:1)   |
| Mezcla 4    | Buffer fosfatos<br>0.3 mol L <sup>-1</sup> pH 2   | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (20:1:1)   |
| Mezcla 5    | HCl 0.04 mol/L                                    | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (20:1:1)   |

<sup>a</sup> Concentración de TPTZ a 10 mmol L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Concentración de FeCl<sub>3</sub> a 20 mmol L<sup>-1</sup>

#### 2.4.5.5 Optimización del método FRAP-SIA

##### *Orden de la secuencia de aspirado*

En la **tabla 2.4** se muestran las combinaciones de secuencias evaluadas para el método FRAP-SIA, así como sus respectivos volúmenes, para obtener la mayor

absorbancia ( $A_{FRAP}$ ) al usar el estándar trolox a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para estos experimentos se usó la programación de la **tabla 2.2**, con un caudal de salida hacia la celda de flujo de  $20 \mu\text{L s}^{-1}$ .

**Tabla 2.4.** Experimentos para la elección de la secuencia de aspirado

| Experimentos | Secuencia de aspirado              | Volumen aspirado ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1            | Antioxidante - FRAP - Antioxidante | 25 – 30 – 25                       |
| 2            | FRAP - Antioxidante - FRAP         | 15 – 50 – 15                       |
| 3            | Antioxidante - FRAP                | 50 - 30                            |
| 4            | FRAP - Antioxidante                | 30 - 50                            |

### **Parámetros hidrodinámicos y químicos**

Para maximizar la respuesta analítica del método FRAP-SIA, se construyó un diseño compuesto central (DCC) dividido en 3 bloques y con 3 puntos centrales por bloque, dando un total de 33 experimentos. Los factores evaluados fueron la secuencia de volumen de aspirado, el caudal de salida al detector, el tiempo de reacción deteniendo el flujo en el bucle de espera, y la concentración del reactivo de FRAP, fijando como variable de respuesta la absorbancia registrada ( $A_{FRAP}$ ).

Los volúmenes de aspirado de muestra y del reactivo FRAP se consideraron para el DCC como un solo factor siguiendo la secuencia de aspirado FRAP-Antioxidante-FRAP. Por otro lado, la concentración del reactivo FRAP fue manejado en términos de porcentaje de su preparación, por lo tanto, al preparar dicho reactivo en proporciones 10:1:1 (HCl ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ): TPTZ ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_3$  ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ )) se consideró como una concentración al 100 %.

La **tabla 2.5** nos muestra los valores bajos, altos y los puntos centrales para cada factor del diseño compuesto central. Los experimentos fueron realizados empleando una disolución de trolox a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  como estándar antioxidante.

**Tabla 2.5.-** Diseño compuesto central en 3 bloques con 3 puntos centrales por bloque, para optimizar el sistema FRAP-SIA

| Factores   | Nivel bajo | Punto central  | Nivel alto |
|--|------------|----------------|------------|
| Concentración del reactivo FRAP (%)                              | 50         | 75             | 100        |
| Volumen de aspirado en $\mu\text{L}$<br>(FRAP-Antioxidante-FRAP) | 10-15-10   | 17.5-22.5-17.5 | 25-30-25   |
| Tiempo de reacción (segundos)                                    | 20         | 40             | 60         |
| Caudal ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )                                  | 20         | 25             | 30         |
| Experimentos totales   | 33         |                |            |

#### 2.4.5.6 Parámetros estadísticos y de validación método FRAP-SIA

##### **Curva de calibración del método**

El método se realizó midiendo a 593 nm la absorbancia del producto de reacción entre el reactivo de FRAP y el estándar de trolox a distintas concentraciones. Dicha absorbancia fue ajustada al restarle la absorbancia del blanco (reactivo de FRAP sin estándar). Se planteó un intervalo de concentraciones de trolox desde  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  hasta  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Tras fijar el intervalo lineal, se construyeron 5 curvas de calibración para obtener una curva promedio a partir de ellas. Los valores de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) fueron calculados a partir del promedio y desviación estándar de la medición de 10 repeticiones del blanco de absorbancia. El cálculo de LD y LC se realizaron a partir de las **ecuaciones 2.4 y 2.5**<sup>90</sup>.

$$\text{LD} = A_B + S_B * 3 \quad \text{Ec. 2.4}$$

$$\text{LC} = A_B + S_B * 10 \quad \text{Ec. 2.5}$$

En donde  $A_B$  corresponde a la absorbancia promedio de las 10 mediciones del blanco y  $S_B$  es la desviación estándar de las mismas.

##### **Método FRAP por microplaca**

El método se realizó de acuerdo con lo reportado por Bolanos y colaboradores<sup>91</sup> con ligeras modificaciones. En una microplaca de 96 pozos fueron dispensados  $280 \mu\text{L}$  del reactivo de FRAP y  $20 \mu\text{L}$  de la muestra o estándar por cada micropozo, obteniendo de esta manera un volumen total de  $200 \mu\text{L}$ . El análisis se realizó a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 593 nm después de 30 min. El reactivo de FRAP fue preparado a partir de la mezcla de disoluciones de TPTZ  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  y buffer de acetatos  $0.3 \text{ mol}$

L<sup>-1</sup> pH 3.6, en una proporción 1:1:10. Se utilizaron disoluciones de trolox de 5 a 200 µmol L<sup>-1</sup> para la curva de calibración. Para los blancos de reacción se utilizó agua destilada en lugar de la muestra o estándar. El análisis de datos fue realizado a partir de la absorbancia registrada del reactivo de FRAP antes y después de reaccionar con la muestra o estándar ( $A_0$  y  $A_s$ ), por tanto, los valores de absorbancia del ensayo FRAP ( $Abs_{FRAP}$ ) fueron calculados usando la **ecuación 2.3**. La curva de calibración fue construida graficando la concentración de trolox contra la  $Abs_{FRAP}$ , y los valores de capacidad antioxidante se reportaron en µmol L<sup>-1</sup> equivalentes de trolox.

### **Recuperaciones**

Inicialmente se midieron la capacidad antioxidante de las siguientes muestras diluidas en agua: vinos tintos merlot y carmenere (ambos al 0.25 %), jugos de uva (0.67 %), arándano (0.50 %), y uva-arándano (0.50 %), extracto de café honey (0.40 %), extracto de tomate (0.01 %) y extracto de té verde (0.25 %). Después de conocer la capacidad antioxidante de las muestras, se prepararon disoluciones fortificadas de cada muestra adicionando 10, 30 y 60 µmol L<sup>-1</sup> del estándar de trolox y nuevamente se midió la capacidad antioxidante.

Además, también se estimaron las recuperaciones del método FRAP por microplacas empleando las mismas muestras, pero a las siguientes concentraciones: vinos tintos merlot y carmenere (al 0.07 y 0.08 %); jugos de uva (1.00 %), arándano (0.29 %), y uva-arándano (0.31 %); extracto de café honey (0.18 %); extracto de tomate (0.06 %); y extracto de té verde (0.10 %). De igual manera, se prepararon disoluciones fortificadas de cada muestra adicionando 10, 80 y 160 µmol L<sup>-1</sup> del estándar de trolox y se midió la capacidad antioxidante antes y después de la fortificación.

Finalmente, para todos los métodos involucrados el porcentaje de recobro se calculó dividiendo la diferencia de capacidad antioxidante de la muestra fortificada y la muestra sin fortificar, entre la concentración de trolox adicionada, y finalmente multiplicado por 100<sup>92,93</sup>.

### **2.4.6. Precisión intermedia de ambos métodos SIA**

La precisión de los métodos ORAC y FRAP por SIA fue evaluada en términos de reproducibilidad y repetibilidad intralaboratorio. Para el método ORAC-SIA se

prepararon y cuantificaron por duplicado disoluciones acuosas de trolox ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) y vino tinto carmenere (0.2 %), durante siete días. En el caso del método FRAP-SIA, se repitió el mismo procedimiento, pero empleando disoluciones acuosas de trolox ( $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) y vino tinto merlot (0.67%).

Cada análisis se realizó por triplicado a las condiciones óptimas del sistema, obteniendo un promedio de la capacidad antioxidante. En cada disolución se cuantificó la capacidad antioxidante expresada en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalente de trolox. Finalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la precisión de ambas metodologías<sup>88,94</sup> y se calcularon los parámetros descritos en la **tabla A2.1 de los anexos**.

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1 Método ORAC-SIA

#### 2.5.1.1 Coeficiente de dispersión.

La dispersión que sufre el bolo de fluoresceína en el sistema SIA fue determinado, a través de la relación matemática de las concentraciones de fluoresceína antes ( $C_0$ ) y después ( $C$ ) de que ocurra el proceso de transporte dentro del sistema SIA<sup>87</sup>. El objetivo de determinar el coeficiente de dispersión fue para conocer con qué concentraciones de fluoresceína se obtenía una señal detectable.

A través de la curva de calibración de concentraciones de fluoresceína ( $0.3 - 15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) vs intensidad fluorescente, medida sin dispersión de fluoresceína, se obtuvieron los datos de regresión lineal que permitieron interpolar la intensidad fluorescente al inyectar  $10 \mu\text{L}$  de fluoresceína a  $12 \mu\text{mol L}^{-1}$  en el sistema SIA. De esta manera se observó que un bolo de fluoresceína a  $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ , al final registraba una intensidad correspondiente a aproximadamente  $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  de fluoresceína, lo cual resultó en un coeficiente de dispersión de  $40.35 \pm 0.59$ .

Por lo tanto, como punto de partida se utilizó una concentración de fluoresceína de  $1.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , debido a que a esta concentración se obtuvo una señal analítica con aproximadamente 8 mil unidades de referencia fluorescente (URF), permitiendo realizar la reacción con el reactivo de AAPH, sin afectación por el ruido del equipo en los experimentos posteriores.

### 2.5.1.2 Condiciones de reacción.

El principal desafío en el método ORAC-SIA fue lograr una oxidación rápida de la fluoresceína por parte de los radicales peroxilo derivados del AAPH y eliminar el nitrógeno gaseoso producido durante la reacción entre ellos.

El método ORAC en microplaca de 96 pocillos y otros métodos ORAC estándar utilizan 37 °C como temperatura óptima de reacción, pero si la temperatura aumenta, la formación de radicales peroxilo (a través del azocompuesto AAPH) también, siendo más rápida la oxidación de la fluoresceína. Los resultados experimentales mostraron una reacción exhaustiva entre AAPH y fluoresceína a 70 °C en poco tiempo, pero este aumento generó una gran cantidad de nitrógeno gaseoso derivado de la formación de radicales peroxilo del AAPH. Incluso a 37 °C, la formación de nitrógeno gaseoso fue considerable e interfirió en la medición de la fluorescencia. La incorporación de una celda de difusión de gas con una membrana de polipropileno, antes del detector, permitió eliminar este nitrógeno gaseoso, y ajustar la temperatura del reactor a 70 °C. Llevar a cabo la reacción a 70 °C proporcionó más energía al sistema de reacción, lo cual redujo la energía de activación necesaria de la reacción y aumentó la velocidad.

Por otra parte, fue posible reducir la concentración inicial de 0.15 mol L<sup>-1</sup> de AAPH (utilizado en el método por microplaca<sup>41</sup>) a 0.05 mol L<sup>-1</sup>, pero fue necesario usar una concentración de fluoresceína de 3 µmol L<sup>-1</sup>, para obtener una señal sin interferencia del ruido del equipo, ya que a 1.8 µmol L<sup>-1</sup> se disminuían tanto la precisión de la señal (picos poco reproducibles) como la sensibilidad del análisis (cambios en la variación de la concentración poco apreciables). En estos ensayos se detuvo el flujo durante 30 s en el reactor y se mantuvo así hasta la optimización de este parámetro.

### 2.5.1.3 Optimización del método

#### *Secuencia de aspirado*

La **tabla 2.6** muestra los resultados de los valores de porcentaje de protección (PP) antioxidante al utilizar un estándar de vainillina. Los valores más altos de protección antioxidante fue para la secuencia **AAPH-antioxidante-fluoresceína**, usando concentraciones de 25 y 100 µmol L<sup>-1</sup> de vainillina con porcentajes de protección de 37.50 y 96.88 %, respectivamente.



Cuando se utilizó vainillina a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  al principio o al final de la secuencia, el PP osciló entre 31 y 37.5 %, y a concentraciones de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  fue entre el 70.37 y 87.50 %.

La posición del antioxidante fue fundamental, ya que una secuencia de **AAPH-antioxidante-fluoresceína** permitió primero mezclar los bolos de AAPH y antioxidante, y después mezclar el producto de reacción con el bolo de la fluoresceína, de tal manera que se evitara que el AAPH reaccionara primero con la fluoresceína y se obtuvieran valores bajos de protección antioxidante.

El ensayo ORAC consta de dos pasos: 1) una reacción entre la fluorescencia y el AAPH con disminución en la intensidad fluorescente de la fluoresceína, y 2) una segunda reacción entre la fluorescencia, el AAPH y un antioxidante para observar la presencia o ausencia de protección de la fluoresceína. El antioxidante competirá con la fluoresceína para reaccionar primero con el AAPH, y si el AAPH reacciona únicamente con el antioxidante, entonces, la intensidad de la fluoresceína permanecerá inalterable. Por el contrario, si el antioxidante reacciona en menor cantidad con el AAPH, la intensidad de la fluoresceína decaerá puesto que el AAPH comenzará a reaccionar con la fluoresceína.

**Tabla 2.6.** Resultados de la evaluación de secuencia de aspirado en función del PP al realizar el método ORAC-SIA con el estándar de vainillina a 25 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$

| Experimentos | Secuencia de aspirado          | Porcentaje de protección (PP) |                              |
|--------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|              |                                | Vainillina 25 $\mu\text{M}$   | Vainillina 100 $\mu\text{M}$ |
| 1            | Antioxidante-AAPH-Fluoresceína | 37.50                         | 87.50                        |
| 2            | Antioxidante-Fluoresceína-AAPH | 33.33                         | 70.37                        |
| 3            | Fluoresceína-AAPH-Antioxidante | 31.25                         | 81.25                        |
| 4            | Fluoresceína-Antioxidante-AAPH | 25.00                         | 87.50                        |
| 5            | AAPH-Fluoresceína-Antioxidante | 37.50                         | 79.17                        |
| 6            | AAPH-Antioxidante-Fluoresceína | 37.50                         | 96.88                        |

( $\mu\text{M}$ ) Concentración expresada en  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Por otro lado, para cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra/estándar, fue necesario conocer las señales correspondientes a los blancos de la señal de fluoresceína sin y con AAPH. Primero, la señal de la fluoresceína sin reaccionar con AAPH fue el primer blanco (B1), y el segundo blanco (B2) fue la señal de la fluoresceína cuando reacciona con AAPH (indicando el máximo decaimiento de la señal de fluoresceína o también interpretado como un 0 % de protección). A medida

que se aspira un compuesto antioxidante en el sistema SIA, junto con AAPH y fluoresceína, la señal de fluoresceína depende de la protección otorgada por el antioxidante. En consecuencia, si el antioxidante no protege, la señal de la fluoresceína mostrará su máximo decaimiento (B2), y si el antioxidante presenta una alta capacidad antioxidante, la señal de la fluoresceína no disminuirá.

**Parámetros químicos del método: concentración de los reactivos**

Para optimizar los parámetros químicos del método ORAC-SIA, se realizó un diseño compuesto central (DCC) dividido en 2 bloques con 3 puntos centrales por bloque, y se evaluaron los factores: concentración de fluoresceína y de AAPH. Las variables de respuesta del diseño fueron los porcentajes de protección (PP) determinados al utilizar vainillina a 25 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . La **tabla 2.7** muestra los resultados del PP de cada experimento.

**Tabla 2.7.** DCC en 2 bloques con 3 puntos centrales, para evaluar los factores concentración de AAPH y fluoresceína, usando como variables de respuesta el PP de vainillina a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$

| Bloque | Concentración de AAPH <sup>a</sup> | Concentración de fluoresceína <sup>b</sup> | PP vainillina 25 <sup>c</sup> | PP vainillina 100 <sup>c</sup> |
|--------|------------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|
| 1.00   | 0.075 0                            | 2.25                                       | 20.47                         | 92.46                          |
| 1.00   | 0.075 0                            | 2.25                                       | 18.42                         | 89.66                          |
| 1.00   | 0.050 0                            | 1.50                                       | 34.13                         | 85.56                          |
| 1.00   | 0.100 0                            | 3.00                                       | 0.00                          | 51.79                          |
| 1.00   | 0.100 0                            | 1.50                                       | 0.00                          | 47.60                          |
| 1.00   | 0.050 0                            | 3.00                                       | 39.34                         | 91.96                          |
| 1.00   | 0.075 0                            | 2.25                                       | 18.24                         | 85.87                          |
| 2.00   | 0.075 0                            | 1.19                                       | 0.00                          | 92.56                          |
| 2.00   | 0.075 0                            | 2.25                                       | 21.03                         | 93.89                          |
| 2.00   | 0.110 4                            | 2.25                                       | 0.00                          | 38.54                          |
| 2.00   | 0.075 0                            | 2.25                                       | 16.20                         | 96.08                          |
| 2.00   | 0.039 6                            | 2.25                                       | 69.17                         | 100.00                         |
| 2.00   | 0.075 0                            | 3.31                                       | 20.77                         | 77.53                          |
| 2.00   | 0.075 0                            | 2.25                                       | 26.94                         | 88.60                          |

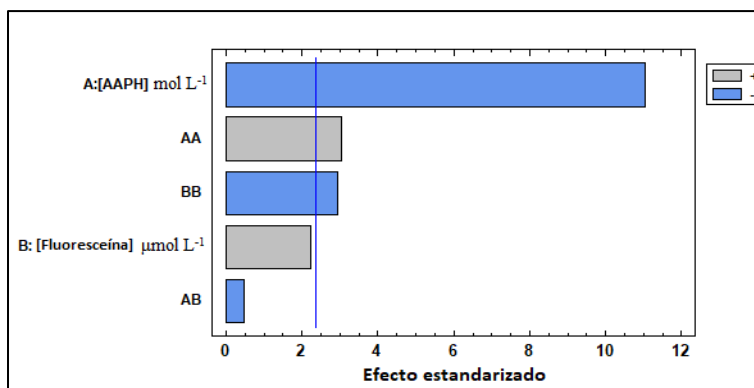
<sup>a</sup> Valores expresados en  $\text{mol L}^{-1}$ ; <sup>b</sup> Valores expresados en  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; <sup>c</sup> Concentración en  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Los resultados del ANOVA del DCC al evaluar cada uno de los factores, indicaron que solamente la concentración de AAPH tuvo una influencia significativa sobre la experimentación (valor  $P < 0.05$ ) (**tablas A2.2 y A2.3 de los anexos**).

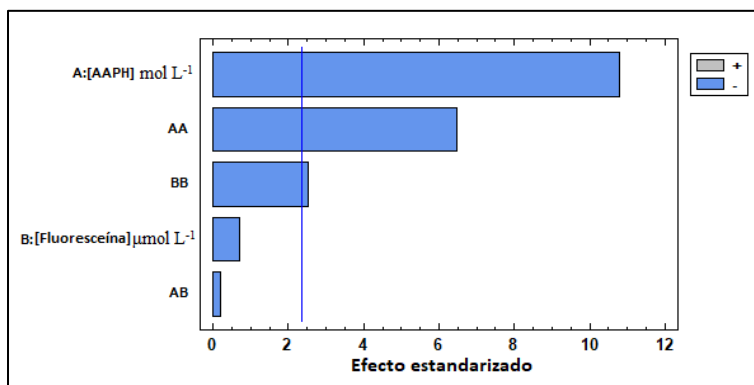
Los diagramas de Pareto de efectos estandarizados (**figura 2.3 y 2.4**) mostraron, con un nivel de significancia del 95 %, la influencia positiva o negativa de cada factor en la variable respuesta, siendo estadísticamente significativos aquellos factores localizados por encima de la línea perpendicular a las barras. Se consideraron los

efectos de cada factor empleando un modelo de interacciones binarias, para un mejor ajuste del modelo matemático del diseño.

El análisis del DCC con PP como variable de respuesta, mostró que al usar concentraciones de vainilla a 25 y 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , solo la concentración del reactivo AAPH influía significativamente sobre los valores del PP.



**Figura 2.3.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para los factores concentración de AAPH y fluoresceína, empleando como variable de respuesta el PP al usar vainillina a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$

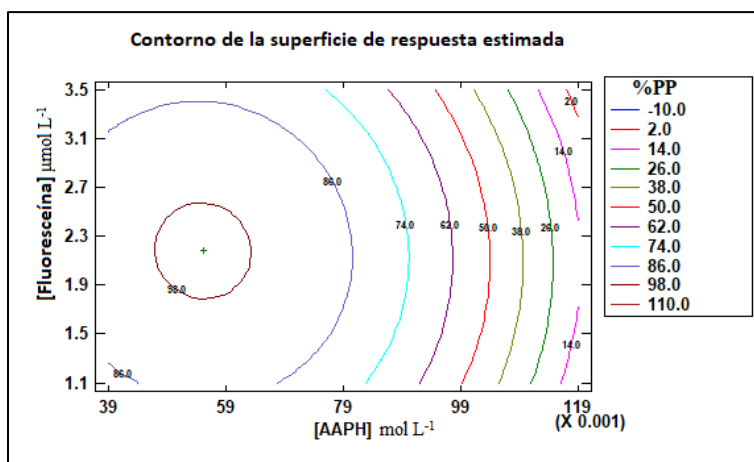


**Figura 2.4.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para los factores concentración de AAPH y fluoresceína, empleando como variable de respuesta el PP al usar vainillina a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Al analizar por separado los diagramas de Pareto, la interpretación de los resultados varió dependiendo de la concentración del estándar de vainillina. Por tanto, al usar una concentración de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  si se reduce la concentración del reactivo AAPH y se aumenta la concentración del reactivo fluoresceína, entonces, se obtendrán valores más altos del PP, pero si se usa una concentración de vainillina a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , disminuye tanto la concentración de fluoresceína como de AAPH. Esto se debe a que la vainillina a concentraciones bajas presenta muy poca capacidad antioxidante, por lo tanto, al reaccionar AAPH con vainillina, esta última no logra proteger a la fluoresceína lo suficiente y entonces disminuye el PP. Por el contrario,

cuando la vainillina se encuentra a concentraciones altas, aumenta la protección de la fluoresceína e incrementa los valores del PP. Sin embargo, debido a que el análisis del diseño fue enfocado hacia obtener los valores más altos del PP se tomó la decisión de optimizar el método ORAC-SIA a partir del análisis de diseño al usar vainillina a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , debido a que todos los experimentos presentaron valores de PP, a diferencia del análisis con vainillina a  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  en donde algunos experimentos no tuvieron valores de PP.

El diagrama de contorno de superficie de respuesta usando vainillina de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (**figura 2.5**), muestra los valores óptimos para las concentraciones de los reactivos, resultando en:  $2.25 \mu\text{mol L}^{-1}$  para fluoresceína y  $0.05 \text{mol L}^{-1}$  para AAPH.



**Figura 2.5.** Diagrama de contorno de la superficie de respuesta estimada para los factores concentración de AAPH y fluoresceína, empleando como variable de respuesta el PP al usar vainillina a 100 µmol L<sup>-1</sup>

**Parámetros hidrodinámicos del método: caudal y volumen de aspirado**

Es fundamental para cualquier método SIA, conocer adecuadamente el caudal para realizar el análisis y establecer una relación entre la reacción química y la dispersión para que los tiempos de análisis no sean demasiado largos. Por otra parte, el volumen de aspirado también es relevante debido a que los volúmenes pequeños permiten reducir costes y minimizar residuos, pero aumenta la dispersión afectando la sensibilidad del método.

Para obtener los valores óptimos de cada parámetro, se utilizó un DFC 2<sup>2</sup> con una réplica. La evaluación se basó en maximizar los valores de porcentaje de protección (PP) y porcentaje de reacción (PR), utilizando vainillina 25 µmol L<sup>-1</sup>. La **tabla 2.8** muestra el diseño factorial.

**Tabla 2.8.** DFC 2<sup>2</sup> con 1 réplica para los factores volumen de aspirado y caudal, utilizando las variables de respuesta el %RP y el %PP de vainillina 25 µmol L<sup>-1</sup>

| Bloque | Volumen <sup>a</sup> | Caudal <sup>b</sup> | %RP    | %PP   |
|--------|----------------------|---------------------|--------|-------|
| 1      | 5                    | 5                   | 100.00 | 0.00  |
| 1      | 5                    | 20                  | 68.64  | 25.08 |
| 1      | 10                   | 20                  | 80.52  | 50.79 |
| 1      | 10                   | 5                   | 100.00 | 0.00  |
| 2      | 5                    | 5                   | 100.00 | 0.00  |
| 2      | 5                    | 20                  | 77.99  | 45.49 |
| 2      | 10                   | 20                  | 84.14  | 59.01 |
| 2      | 10                   | 5                   | 100.00 | 0.00  |

<sup>a</sup> Volumen en µL

<sup>b</sup> Caudal en µL s<sup>-1</sup>

Los resultados del ANOVA del DFC (tablas A2.4 y A2.5 de los anexos) mostraron que solo el caudal tuvo una influencia significativa en ambas variables de respuesta (PP y PR). Los diagramas de Pareto de efectos estandarizados (figura 2.6 y 2.7) sugieren que a caudales altos los valores del PP aumentan, pero los valores de PR disminuyen. En adición, cuando se aumentan los volúmenes de reactivos y muestra, también incrementan los valores del PP y PR.

Debido a que el análisis del diseño se realizó para dos variables de respuesta (PP y PR), entonces se obtuvieron dos opciones de valores óptimos sugeridos por cada análisis de su respectiva variable de respuesta. Así, cuando la variable de respuesta era el PR, entonces los valores óptimos de caudal y volumen de aspirado fueron de  $5 \mu\text{L s}^{-1}$  y  $10 \mu\text{L}$ , respectivamente, pero cuando la variable de respuesta era el PP, el valor óptimo para caudal fue de  $20 \mu\text{L s}^{-1}$ .

Finalmente, se optó por el valor de caudal de  $20 \mu\text{L s}^{-1}$ , ya que el caudal de  $5 \mu\text{L s}^{-1}$  fue tan bajo que el bolo del producto de reacción se dispersó demasiado en la corriente portadora, imposibilitando su detección y, por lo tanto, la medición del PP.

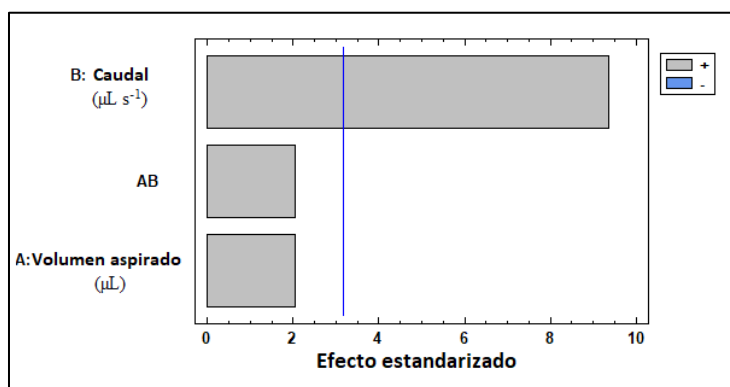
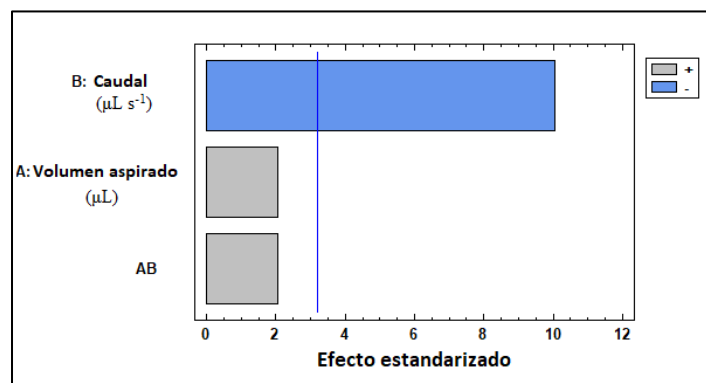


Figura 2.6. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados, utilizando como variable de respuesta el %PP de vainillina  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  y como factores los volúmenes aspirados y caudales



**Figura 2.7.** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados, usando %RP sin estándar como variable de respuesta, y volúmenes aspirados y tasas de flujo como factores

### ***Evaluación del tiempo de reacción del método***

La capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC por microplaca se calcula graficando curvas cinéticas (tiempo frente a intensidad fluorescente) después de un tiempo de 90 min. Se utiliza el método trapezoidal restando el AUC sin antioxidante al AUC con antioxidante.

En el método propuesto la altura de los picos (señal analítica) fue suficiente para calcular el PP y PR, haciendo al método más fácil y rápido. Esto fue posible gracias a que los bolos aspirados de AAPH, antioxidante y fluoresceína, permitieron mezclarse por difusión de gradiente (desplazamiento de una sustancia de una zona de mayor concentración a otra de menor concentración), de tal manera que se formará un bolo de producto de reacción con perfil parabólico que al llegar al detector registrará una señal (pico) sin presentar una alta dispersión con la corriente portadora. De tal manera que, la altura máxima del pico fuera proporcional al PP de la muestra antioxidante.

El análisis de los tiempos de reacción (parando el flujo en el reactor) en intervalos de 0 a 30 segundos, no mostró diferencias significativas entre los valores de PR en el intervalo analizado, manteniendo siempre un 100 % de reacción (decaimiento total de la señal de fluoresceína). Los valores del PP incrementaron proporcionalmente a diferentes concentraciones de trolox. Por lo tanto, no fue necesario detener el flujo para realizar el análisis, con la ventaja de utilizar la altura de los picos SIA en lugar del AUC. Cabe destacar que en los ensayos ORAC convencionales necesitan un tiempo de reacción de 90 min para establecer el 100 % de reacción entre AAPH y fluoresceína (B2).

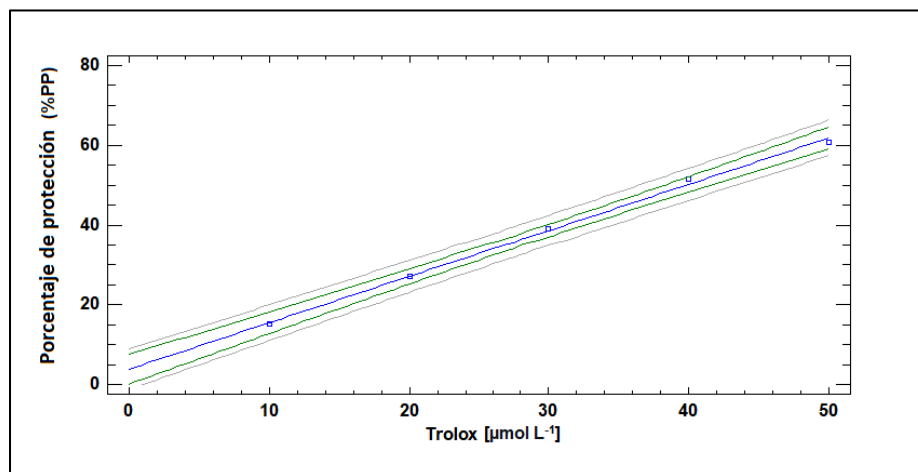
#### **2.5.1.4 Características del método**

##### ***Intervalo lineal y curva de calibración***

El PP fue la respuesta para evaluar la capacidad de protección de un antioxidante para proteger a la fluoresceína frente al AAPH, por lo que los resultados fueron expresados en equivalentes de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox. Se elaboraron siete curvas de calibración con un intervalo de concentración de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox y se

estimaron sus respectivos parámetros estadísticos (**figura A2.2 y tabla A2.6 de los anexos**) y mediante un ANOVA de los datos se demostró una relación directamente proporcional entre la respuesta (PP) y la concentración del estándar trolox con un 95 % de significancia ( $P < 0.05$ ).

Una curva promedio (**figura 2.8**) fue construida con los datos de las siete curvas de calibración mostrando una varianza homocedástica y una excelente linealidad en un intervalo de concentración de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  con un coeficiente de determinación de 0.997. La ecuación de regresión tuvo una pendiente de  $1.15 \pm 0.02$  y una intersección de  $3.89 \pm 0.89$ . Los LD y LC fueron de 3.13 y 9.48  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Es importante destacar que la sensibilidad de este ensayo fue mejorada en comparación con informes anteriores por métodos basados en flujo para la determinación de la capacidad antioxidante<sup>58,95,96</sup>.



**Figura 2.8.** Promedio de la curva de calibración utilizando estándares de trolox de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  con un intervalo de confianza del 95 % para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC-SIA

### **Correlación entre los métodos ORAC-SIA y ORAC-microplaca**

El método de ORAC por microplaca obtuvo una curva de calibración con un intervalo lineal de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , una pendiente de  $1.29 \pm 0.05$ , intersección de  $4.17 \pm 1.57$ , LD de 3.82  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y LC de 11.57  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados en la literatura<sup>41</sup>.

Se graficaron los valores del PP obtenidos por el método ORAC-SIA y ORAC-microplaca, obteniendo una correlación superior al 99 % y demostrando que la sensibilidad era similar.



En la **tabla 2.9** se muestra una comparación de los valores de regresión y precisión de otros métodos (FIA, SIA y microplaca) reportados en la literatura para determinar la capacidad antioxidante, denotando que los datos del método ORAC-SIA propuesto tienen una DER más baja que el método ORAC por microplaca<sup>41</sup>, y también indicando una excelente precisión y mejor sensibilidad con respecto al método ORAC-FIA<sup>58</sup>.

Por otro lado, se señala que los otros métodos para determinar la capacidad antioxidante por sistemas de flujo tienen sensibilidades más bajas que sus contrapartes por microplaca. En el caso del método ORAC-FIA reportado en 2016, se observa que su sensibilidad disminuyó 5 veces respecto al método por microplaca debido al cambio de detección de fluorimetría a espectrofotometría UV-Visible. De esta manera, el método ORAC-SIA propuesto presenta una mejora notable de la sensibilidad (hasta 4 veces) con respecto al primer método de flujo informado en 2016 para el ensayo ORAC.

**Tabla 2.9.** Comparación de las características entre el método ORAC-SIA propuesto con diferentes métodos publicados para determinar la capacidad antioxidante

| Método            | LC <sup>a</sup> | m           | Intervalo lineal <sup>a</sup> | Estándar      | r           | %DER <sub>r</sub> | %DER <sub>re</sub> | Referencia              |
|-------------------|-----------------|-------------|-------------------------------|---------------|-------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| ORAC microplaca   | 5               | 1.5         | 6.25 - 50                     | Trolox        | 0.99        | < 15 %            | < 15 %             | 72                      |
| DPPH microplaca   | N. R            | 0.15        | 50 - 500                      | Trolox        | 0.99        | 1.06 – 8.28 %     | 1.32 – 2.13 %      | 97                      |
| CUPRAC microplaca | 3               | 7.11        | 12.5 - 200                    | Ác. Úrico     | 0.99        | 1.00 %            | 6.10 %             | 98                      |
| FRAP microplaca   | N. R            | N. R        | 90 - 540                      | Trolox        | 0.99        | 4.80 %            | 5.60 %             | 99                      |
| ORAC - FIA        | 8               | 0.3         | 18 - 180                      | Trolox        | N. R        | 3.0 - 3.4 %       | < 4.9 %            | 100                     |
| DPPH - SIA        | 1               | N. R        | 10 - 40                       | Ác. Cafeico   | N. R        | N. R              | 3.90 %             | 101                     |
| CUPRAC - FIA      | 11              | 2.8         | 25 – 300                      | Trolox        | 0.99        | 0.98 %            | 2.80 %             | 98                      |
| ABTS - SIA        | 24.7            | -0.03       | 0 - 235.13                    | Ác. gálico    | 0.99        | 6.40 %            | N. R               | 102                     |
| <b>ORAC - SIA</b> | <b>3.13</b>     | <b>1.15</b> | <b>10-50</b>                  | <b>Trolox</b> | <b>0.99</b> | <b>2.15 %</b>     | <b>2.65 %</b>      | <b>Método propuesto</b> |

<sup>a</sup> Concentraciones expresadas en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox.

(r) coeficiente de correlación; (DER<sub>r</sub>) desviación estándar relativa de repetibilidad; (DER<sub>re</sub>) desviación estándar relativa de reproducibilidad; (LC) límite de cuantificación; (m) pendiente de la regresión lineal; (N. R) no reportado.

### **Análisis de muestras**

Empleando el método ORAC-SIA se analizaron diversas muestras alimenticias y se compararon los resultados con los obtenidos por el método ORAC por microplaca<sup>41</sup>. En la **tabla 2.10** se muestran los resultados expresados en  $\mu\text{mol trolox por mL}$  de muestra. Después de realizar una prueba estadística *t* de Student para muestras pareadas, con 95 % de confiabilidad ( $\alpha$  de 0.05 a dos colas), los métodos no tuvieron

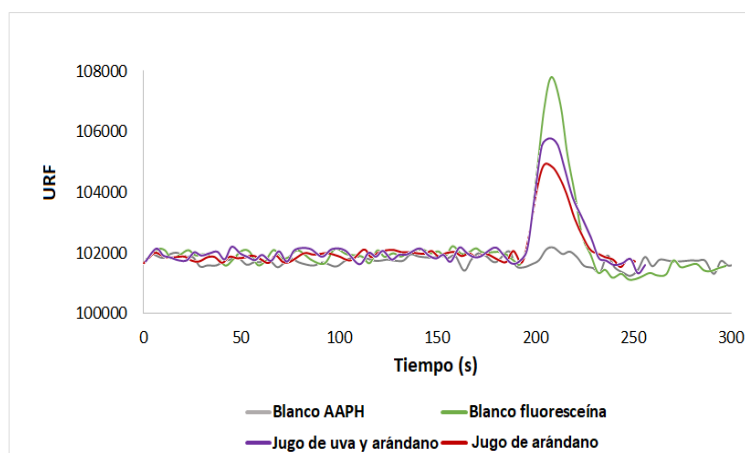
diferencias significativas en sus resultados ( $t_0 = 0.84$  y  $t_c = 2.26$ ), mostrando la confiabilidad del método ORAC-SIA propuesto.

El método propuesto demostró no necesitar de un tiempo de análisis prolongado para alcanzar el equilibrio de la reacción, siendo posible cuantificar la capacidad antioxidante midiendo solo una parte de la cinética de la reacción sin afectar la medición. En la **figura 2.9** se muestra la señal obtenida de fluoresceína, sola, con AAPH y con muestra.

**Tabla 2.10.** Resultados de la capacidad antioxidante en diferentes muestras de alimentos analizadas por el método ORAC-SIA propuesto y el método convencional de microplacas

| Muestras                     | Capacidad antioxidante <sup>a</sup> |                |
|------------------------------|-------------------------------------|----------------|
|                              | SIA                                 | Microplaca     |
| Extracto de vainilla         | 42.99 +/- 4.60                      | 43.49 +/- 1.51 |
| Vino tinto Merlot            | 21.94 +/- 0.99                      | 20.23 +/- 2.02 |
| Vino tinto Carmenere         | 18.84 +/- 2.65                      | 17.97 +/- 2.85 |
| Extracto de café honey       | 7.27 +/- 0.61                       | 6.98 +/- 0.00  |
| Extracto de café lavado      | 9.57 +/- 0.03                       | 9.59 +/- 0.12  |
| Néctar de manzana y arándano | 4.04 +/- 0.09                       | 3.94 +/- 0.19  |
| Néctar de uva                | 2.45 +/- 0.16                       | 2.70 +/- 0.24  |
| Jugo de uva y arándano       | 2.74 +/- 0.25                       | 3.15 +/- 0.28  |
| Néctar de arándano           | 1.74 +/- 0.03                       | 1.78 +/- 0.01  |

<sup>a</sup> Expresada en  $\mu\text{mol}$  de Trolox por mL de muestra.



**Figura 2.9.** Señales del sistema ORAC-SIA para el blanco de fluoresceína (B2), el 100 % de la reacción (blanco AAPH (B1)) y dos muestras

### Recuperaciones

Los valores de recuperación para el método ORAC-SIA oscilaron entre 86 y 107.50 % para las muestras fortificadas (jugo de arándano, extracto de vainilla, extracto de café y vino carmenere) con concentraciones de trolox de 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (tabla 2.11). De acuerdo con los criterios de la AOAC<sup>103</sup> estos valores se encuentran

dentro de los intervalos aceptables de recuperación (85–110 %). Por tanto, los resultados indicaron que no existen interferencias significativas de la matriz.

**Tabla 2.11.** Porcentajes de recuperación para 4 muestras adicionadas con diferentes concentraciones de Trolox

| <b>Muestra</b>                 | <b>Capacidad antioxidante de muestra <sup>a</sup></b> | <b>Concentración adicionada <sup>a</sup></b> | <b>Porcentaje de recuperación</b> |
|--------------------------------|---|--|-----------------------------------|
| Jugo de arándano al 0.66 %*    | 11.41   | 20.00  | 94.61                             |
|                                |   | 30.00  | 104.42                            |
|                                |   | 40.00  | 100.87                            |
| Vino tinto Carmenere al 0.05 % | 12.73   | 10.00  | 102.41                            |
|                                |   | 20.00  | 100.60                            |
|                                |   | 30.00  | 102.02                            |
|                                |   | 40.00  | 100.08                            |
| Extracto de vainilla al 0.05 % | 22.94   | 10.00  | 105.37                            |
|                                |   | 20.00  | 97.70                             |
|                                |   | 30.00  | 98.26                             |
|                                |   | 40.00  | 88.54                             |
| Extracto de café al 0.06 %     | 16.41   | 10.00  | 86.90                             |
|                                |   | 20.00  | 97.87                             |
|                                |   | 30.00  | 104.30                            |
|                                |   | 40.00  | 107.50                            |

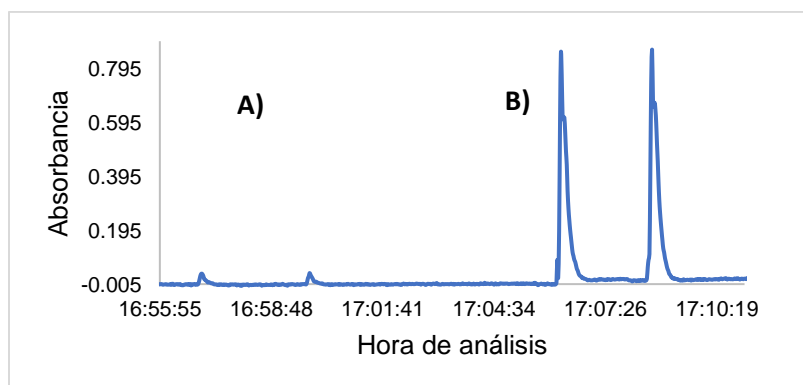
<sup>a</sup> Expresado en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox.

\* Para concentraciones más altas que 0.1 %, los valores de referencia son 90 – 108 %.

## 2.5.2 Método FRAP-SIA

### 2.5.2.1 Condiciones de reacción del método FRAP-SIA

La longitud de onda del reactivo FRAP reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) fue de 593 nm. En la **figura 2.10** se muestra el blanco de la reacción, el reactivo FRAP sin reaccionar con trolox, con absorbancia inferior a 0.05, y el reactivo FRAP con trolox a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ . La señal aumentó 0.8 unidades de absorbancia; a partir de estos datos se llevó a cabo la optimización.



**Figura 2.10.** Evaluación de reacción del ensayo FRAP y el estándar de trolox a  $400 \mu\text{mol/L}$ . A) reactivo FRAP sin estándar; B) reactivo FRAP con estándar

Es importante destacar que usar una secuencia de aspirado **antioxidante-FRAP-antioxidante**, favoreció a que los dos bolos de trolox a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  se difundieran por gradiente hacia el bolo del reactivo de FRAP. Por tanto, el bolo del producto de reacción formado por la reacción entre el trolox y el reactivo de FRAP pudo ser detectable debido a que no se requirió un tiempo de reacción parando el flujo del sistema SIA, lo cual evitó que este bolo se dispersara con la corriente portadora y presentara un pico SIA predominantemente difusivo.

### 2.5.2.2 Estabilidad del reactivo FRAP

En 2013, Martins y colaboradores propusieron el primer ensayo FRAP adaptado a un método de flujo que proporciona una frecuencia de análisis de 30 muestras por hora, utilizando volúmenes de muestra/reactivo de  $91.4 \mu\text{L}$  y duplicando la concentración de reactivos FRAP<sup>57</sup>. Sin embargo, la forma de preparar el reactivo FRAP ( $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ ) fue similar a la reportada por primera vez por Benzie y Strain en 1996, mezclando una disolución amortiguadora de acetato  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  pH 3.6,  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  de TPTZ y  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_3$  en una proporción 10:1:1, sin

considerar que la formación del reactivo FRAP es inestable, precipitando después de 40 min de su preparación.

De tal manera se preparó el reactivo FRAP de acuerdo con lo reportado por Benzie y evaluando su estabilidad a cambios físicos durante 2 horas. Se observó que se formaron partículas sólidas insolubles después de 40 minutos de su preparación.

Al realizar el ensayo FRAP con un estándar de trolox  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , se obtuvo que después de 55 min de la preparación del reactivo, las absorbancias tuvieron una variación mayor a la desviación estándar de las repeticiones realizadas en los primeros 50 min (lecturas cada 5 minutos). Esto se debió a que la concentración del reactivo FRAP varió a medida que la disolución formaba mayores cantidades de partículas sólidas insolubles que interfirieron con la reacción.

Inicialmente, se propuso que la disolución amortiguadora de acetatos a  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  y pH 3.6, la cual no contaba con la capacidad de amortiguar, debido a que la disolución amortiguadora se encontraba en los límites de su zona de amortiguamiento, ya que el pH fijado estaba por debajo de una unidad del pKa del ácido acético (4.7).

Por lo tanto, se evaluaron diferentes medios para estabilizar el reactivo de FRAP. Los medios sugeridos para mezclar los reactivos TPTZ y  $\text{FeCl}_3$  se centraron en el uso de disoluciones amortiguadoras de acetatos a  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  y pH 4.7 (pKa 4.7), de fosfato a  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$  y pH 2 (pKa 2.1), y una disolución de HCl a  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$  y pH 1.4, mezclados en proporciones 10:1:1 y 20:1:1.

Los resultados de la experimentación mostraron que, aunque la disolución amortiguadora de acetatos se preparó a un pH con una zona de amortiguamiento viable, el reactivo de FRAP precipitó a los 40 min. La estequiometría de reacción entre el  $\text{FeCl}_3$  y el ligante TPTZ es de 1 a 2, para formar el complejo  $([\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+})$ . Las concentraciones empleadas fueron de  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  para el  $\text{FeCl}_3$  y  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  para el TPTZ, si se considera que la reacción llegó al equilibrio, quedaron concentraciones de  $0.0015 \text{ mol L}^{-1}$  para el  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$  para el  $([\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+})$  y prácticamente reacciona todo el TPTZ. El exceso de  $\text{Fe}^{3+}$  pudo haber formado  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , debido a que un pH mayor a 4.42 favorece a la formación de este hidróxido (considerando un pKs de 38.8) y la disolución amortiguadora de acetatos fue preparada a pH de 4.7.

Por otro lado, al usar una disolución amortiguadora de fosfato a pH 2, el reactivo FRAP también precipitó, lo que podría ser causado nuevamente por el exceso de reactivo  $\text{Fe}^{3+}$ , lo que provocó que los iones fosfato presentes en la disolución amortiguadora se unieran al  $\text{Fe}^{3+}$ , formando así fracciones de precipitado de  $\text{FePO}_4$  en el reactivo FRAP. Finalmente, al utilizar HCl  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$  (misma concentración con la que se prepara el reactivo TPTZ) como medio de preparación para el reactivo FRAP, se observó que el reactivo se mantuvo estable hasta por una semana sin presentar precipitación, siendo esto una mejoría sustancial. El reactivo de FRAP fue estable usando HCl  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$  cuando se mezcló con el  $\text{FeCl}_3$  en diferentes proporciones. La concentración de HCl se probó hasta una concentración de  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2.3) para preparar el reactivo de FRAP, lo que resultó en una disolución estable durante 24 h. También hay que considerar que la estabilidad del reactivo FRAP no depende de la exposición a la luz. Finalmente, se decidió utilizar una mezcla de HCl ( $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ), TPTZ ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) y  $\text{FeCl}_3$  ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ) en la proporción 10:1:1, para preparar el reactivo FRAP.

### 2.5.2.3 Optimización del método

#### *Secuencia de aspirado del método*

En la **tabla 2.12** se muestran los resultados obtenidos del método FRAP-SIA para evaluar las 4 secuencias de aspirado propuestas frente a un estándar de trolox a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Los experimentos 2 y 4 mostraron los valores más altos de absorbancia, sin embargo, se optó por usar la secuencia del experimento 2 (FRAP - Antioxidante – FRAP), dado que presentó un valor más alto y con menor desviación estándar que el experimento 4. Por otra parte, la secuencia **FRAP-Antioxidante-FRAP** sugiere que el bolo del producto de reacción se ve favorecido por la difusión que existe entre los 2 bolos de FRAP que rodean al bolo del antioxidante, permitiendo una mejor mezcla entre el antioxidante y el reactivo de FRAP, generando concentraciones mayores de producto (con valores más altos de absorbancia) en comparación con las otras combinaciones.

**Tabla 2.12.-** Resultados de la evaluación de secuencia de aspirado en función de la absorbancia al implementar el método FRAP-SIA con el estándar trolox a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$

| Experimentos | Secuencia de aspirado              | Volumen aspirado ( $\mu\text{L}$ ) | Absorbancia       |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| 1            | Antioxidante - FRAP - Antioxidante | 25 – 30 – 25                       | $0.363 \pm 0.013$ |
| 2            | FRAP - Antioxidante - FRAP         | 15 – 50 – 15                       | $0.387 \pm 0.002$ |
| 3            | Antioxidante - FRAP                | 50 - 30                            | $0.332 \pm 0.009$ |
| 4            | FRAP - Antioxidante                | 30 - 50                            | $0.383 \pm 0.003$ |

### ***Parámetros químicos e hidrodinámicos del método***

Se evaluaron los siguientes factores: concentración del reactivo FRAP, los volúmenes de aspirado de cada reactivo, el caudal de salida a detector y el tiempo de reacción, utilizando un DCC en 3 bloques y con 3 puntos centrales. Se utilizó una disolución de trolox a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  como estándar antioxidante. Los resultados obtenidos en el DCC son mostrados en la **tabla 2.13**.

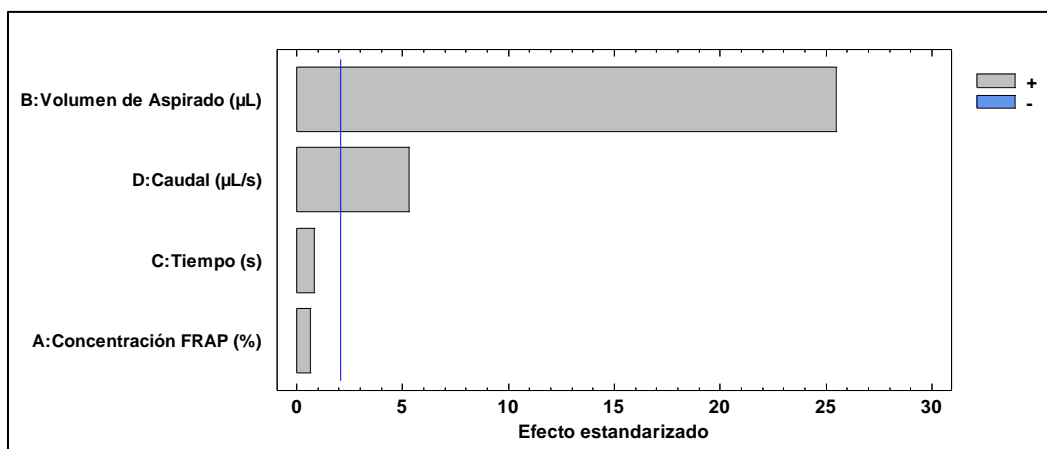


**Tabla 2.13.** DCC en 3 bloques con 3 puntos centrales, para evaluar los factores concentración FRAP, volumen de aspirado, caudal y tiempo, usando absorbancia como variable de respuesta y trolox 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  como estándar

| Bloque | Concentración FRAP <sup>a</sup> | Volúmenes de aspirado <sup>b</sup> | Tiempo <sup>c</sup> | Caudal <sup>d</sup> | Abs     |
|--------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| 1      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.185 0 |
| 1      | 100                             | 10-15-10                           | 20                  | 20                  | 0.126 7 |
| 1      | 100                             | 10-15-10                           | 60                  | 30                  | 0.143 7 |
| 1      | 100                             | 25-30-25                           | 20                  | 30                  | 0.254 0 |
| 1      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.186 3 |
| 1      | 50                              | 25-30-25                           | 60                  | 30                  | 0.257 3 |
| 1      | 50                              | 25-30-25                           | 20                  | 20                  | 0.220 7 |
| 1      | 50                              | 10-15-10                           | 60                  | 20                  | 0.134 7 |
| 1      | 50                              | 10-15-10                           | 20                  | 30                  | 0.133 7 |
| 1      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.187 7 |
| 1      | 100                             | 25-30-25                           | 60                  | 20                  | 0.222 3 |
| 2      | 100                             | 10-15-10                           | 60                  | 20                  | 0.126 0 |
| 2      | 50                              | 25-30-25                           | 60                  | 20                  | 0.232 0 |
| 2      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.200 7 |
| 2      | 100                             | 25-30-25                           | 60                  | 30                  | 0.264 3 |
| 2      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.205 0 |
| 2      | 50                              | 25-30-25                           | 20                  | 30                  | 0.265 3 |
| 2      | 100                             | 10-15-10                           | 20                  | 30                  | 0.144 7 |
| 2      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.207 3 |
| 2      | 50                              | 10-15-10                           | 20                  | 20                  | 0.127 0 |
| 2      | 100                             | 25-30-25                           | 20                  | 20                  | 0.228 7 |
| 2      | 50                              | 10-15-10                           | 60                  | 30                  | 0.147 3 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.196 3 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 15                  | 0.176 3 |
| 3      | 125                             | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.191 7 |
| 3      | 75                              | 2.5-7.5-2.5                        | 40                  | 25                  | 0.069 7 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 0                   | 25                  | 0.192 7 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 80                  | 25                  | 0.199 3 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.199 3 |
| 3      | 25                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.172 3 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 25                  | 0.204 7 |
| 3      | 75                              | 17.5-22.5-17.5                     | 40                  | 35                  | 0.211 7 |
| 3      | 75                              | 32.5-37.5-32.5                     | 40                  | 25                  | 0.269 3 |

<sup>a</sup> valores expresados en porcentajes; <sup>b</sup> volumen expresado en  $\mu\text{L}$  (secuencia FRAP-Antioxidante-FRAP); <sup>c</sup> tiempo en segundos; <sup>d</sup> caudal expresado en  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

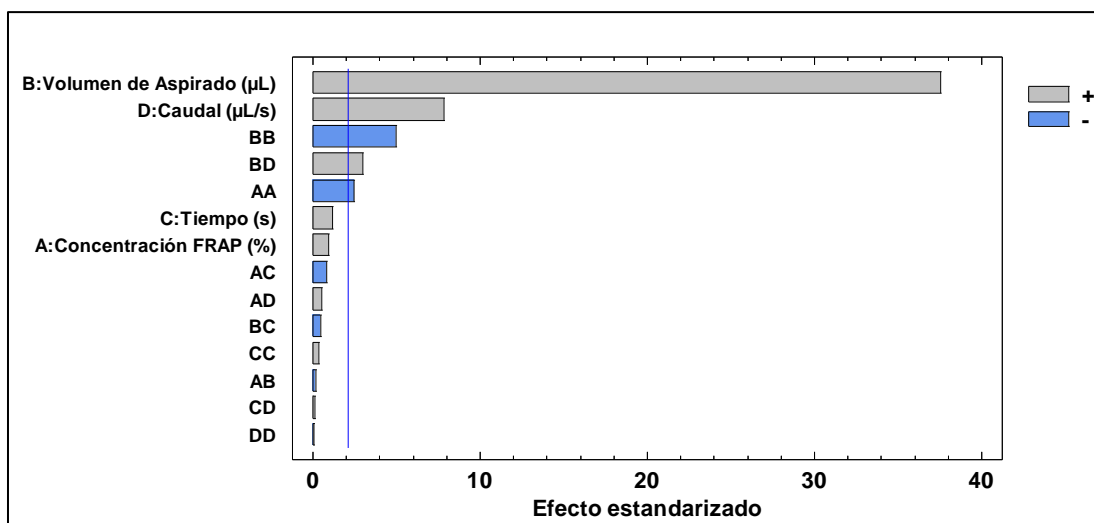
El diagrama de Pareto de efectos estandarizados del DCC (nivel de significancia del 95 %) mostró las influencias positivas o negativas de cada factor en la variable respuesta. Se consideraron los efectos de cada factor y sus interacciones binarias para obtener un mejor ajuste al modelo del diseño. Se observó que el volumen de aspirado y el caudal tuvieron una influencia significativa en la respuesta ( $A_{FRAP}$ ), estableciendo que, a valores altos de volumen de aspirado y caudal de salida, los valores de  $A_{FRAP}$  incrementaban. La **figura 2.11** muestra el diagrama de Pareto para los efectos principales del DCC.



**Figura 2.11.** Diagrama de Pareto estandarizado de efectos principales, para maximizar la respuesta del sistema FRAP-SIA

En contraste, al considerar las interacciones binarias de cada factor, hubo una influencia significativa sobre el diseño en el volumen de aspirado (BB), la concentración de FRAP (AA), el caudal (D), la interacción del volumen de aspirado y el caudal (BD), estableciendo que a menor volumen de aspirado y menor concentración del reactivo FRAP se obtienen mayores valores de  $A_{FRAP}$ .

Por otro lado, la interacción volumen y el caudal indicó que mientras estos dos factores incrementan al mismo tiempo en un mismo experimento, los valores de  $A_{FRAP}$  también incrementan. En la **figura 2.12** es posible apreciar el diagrama de Pareto para los efectos del DCC con interacciones binarias.



**Figura 2.12.** Diagrama de Pareto estandarizado con interacciones binarias de los factores, para maximizar la respuesta del sistema FRAP-SIA

Los resultados del ANOVA (**tabla A2.7 de los anexos**) para cada factor indicaron que el volumen de aspirado, la concentración de la disolución de FRAP, el caudal, la interacción binaria del volumen de aspirado y el caudal tuvieron una influencia significativa en el experimento (valor  $P < 0.05$ ).

Los valores de  $R^2$  del DCC fue de 98.960 %, indicando un buen ajuste entre los valores experimentales de  $A_{FRAP}$  con los predichos por el modelo de regresión.

Finalmente, los valores óptimos se estimaron a partir del diseño que maximizó los valores de  $A_{FRAP}$  con interacciones binarias, lo que resultó en  $35 \mu\text{L s}^{-1}$  para el caudal, un tiempo de espera de 0 segundos, una concentración de FRAP al 80 % y volúmenes de aspirado de 33-38-33  $\mu\text{L}$  para la secuencia FRAP-Antioxidante-FRAP.

#### 2.5.2.4 Características del método FRAP-SIA

##### *Intervalo lineal y curva de calibración*

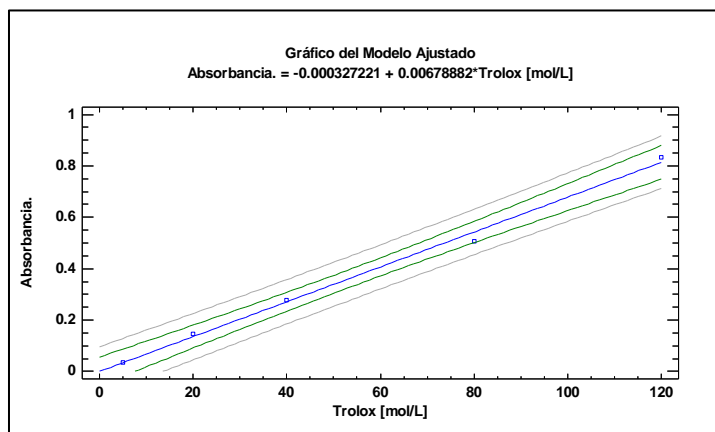
En el método FRAP-SIA se graficaron las  $A_{FRAP}$  obtenidas al utilizar concentraciones de trolox en un intervalo de 5 a  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ , estableciendo un intervalo lineal con concentraciones de 5 a  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Con la finalidad de obtener un mejor estimado de las curvas de calibración entre un día y otro, se construyó una curva diariamente durante 5 días y se estimaron cada uno de sus parámetros (**figura A2.3 y tabla A2.8 de los anexos**).

Empleando los datos de las 5 curvas de calibración, se construyó una curva promedio. En adición, se realizó un análisis de los residuales (diferencia entre los

valores de absorbancia observados y los predichos por la recta de regresión) a través del gráfico de los residuos (**figura A2.4 de los anexos**) en función de la concentración del estándar de trolox. Dicho gráfico presentó una distribución aleatoria y sin ningún tipo de tendencia al variar la concentración de trolox. De esta manera fue posible aseverar que los datos de las curvas se ajustan al modelo de regresión lineal tipo 1, dando como resultado una varianza homocedástica.

El ANOVA de los datos de las 5 curvas de calibración (**tabla A2.9 de los anexos**), demostró una relación directamente proporcional entre la respuesta ( $A_{FRAP}$ ) y la concentración de trolox con un nivel de significancia de 95 %, ya que el valor- $P$  obtenido es menor a 0.05. Por tanto, al emplear los datos de las 5 curvas de calibración, se construyó una curva promedio (**figura 2.13**), para cuantificar la capacidad antioxidante expresada en equivalentes  $\mu\text{mol L}^{-1}$  trolox.



**Figura 2.13.** Curva promedio de calibración de trolox de 5 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  con su intervalo de confianza al 95 % para la determinación de capacidad antioxidante

La ecuación de regresión lineal de la curva de calibración promedio mostró una pendiente de  $0.0064 \pm 9.4 \times 10^{-5}$  y una intersección de  $0.0049 \pm 6.4 \times 10^{-3}$  con un intervalo de confianza al 95 %. Los valores de LD y LC fueron de 1.0 y 1.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

### **Correlación entre los métodos FRAP-SIA y FRAP-microplaca**

Los valores de absorbancia del método FRAP-SIA y FRAP-microplaca se graficaron utilizando disoluciones estándar de trolox a concentraciones de 5 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para obtener una gráfica de correlación entre ambos métodos. En consecuencia, se obtuvo una correlación directa de las respuestas analíticas del 98 % por ambos métodos al realizar el ensayo FRAP, reafirmando la confiabilidad de los valores de capacidad antioxidante por el método FRAP-SIA propuesto.

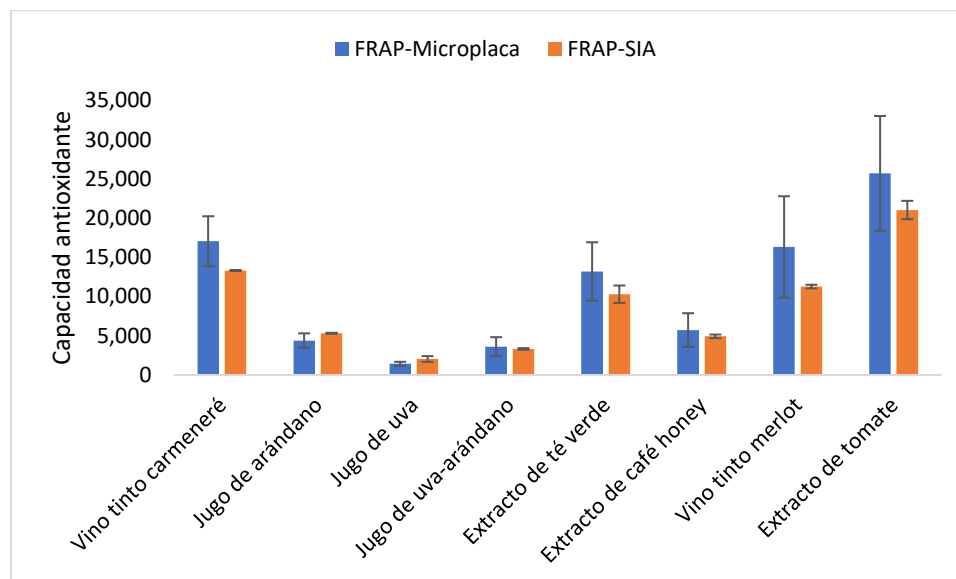
Aunque el ensayo FRAP es uno de los ensayos más citados para determinar la capacidad antioxidante total, su implementación de microplacas no se ha calibrado adecuadamente, por lo que no se han determinado parámetros de calibración universales para fines de control de calidad. Por ejemplo, la dependencia del paso óptico en el volumen de la muestra conduce a resultados de ensayos de microplacas que carecen de precisión entre laboratorios. Así lo demostraron Bolanos y colaboradores en 2015 al verificar que los lectores de microplacas disminuyen la sensibilidad del análisis colorimétrico en comparación con los datos de un espectrofotómetro de paso óptico de 1 cm<sup>81</sup>. También hay poca información sobre la validación del ensayo FRAP-microplaca, siendo Ustundag y colaboradores en 2016 los primeros en reportar los parámetros de validación<sup>104</sup>, quienes describen que a pesar de que el ensayo FRAP-microplaca reduce el consumo en volumen de reactivos y muestra, y aumenta la frecuencia de muestreo, también es demasiado pobre con respecto a la precisión y exactitud del método, reportando un coeficiente de variación (CV) del 18.5 % y recuperaciones con una tendencia inferior al 100 %, lo que indica un claro error sistemático. Estos altos valores de CV del ensayo FRAP-microplaca se atribuyen principalmente al error del analista al dispensar pequeños volúmenes (10-200 µL) de muestra y reactivos en los pocillos de microplaca, ya que es muy complejo.

En cuanto a reproducibilidad también han afectado otros ensayos para determinar la capacidad antioxidante, como ORAC por microplaca, porque la reacción de inhibición antioxidante no comienza en los 96 pocillos al mismo tiempo por limitaciones técnicas al dosificar el antioxidante y el radical<sup>73</sup>. Por esta razón, el método FRAP-SIA propuesto es una mejor alternativa para determinar la capacidad antioxidante, a diferencia del método de microplaca, que presenta una mayor variabilidad en los resultados de la capacidad antioxidante.

### ***Análisis de muestras***

En la **figura 2.14** y la **tabla A2.10 de los anexos**, se muestran los resultados por FRAP-SIA y FRAP-microplaca. Después de analizar los valores de capacidad antioxidante por ambos métodos, se consideró que ambos resultados eran estadísticamente similares, lo que demuestra que el método FRAP-SIA es una alternativa adecuada para determinar la capacidad antioxidante, mejorando la

precisión en comparación con el método de microplaca y minimizando los errores asociados con la manipulación del analista.



**Figura 2.14.** Gráfico comparativo de los valores de capacidad antioxidante analizados por FRAP-SIA y FRAP-Microplaca

### **Recuperaciones**

El efecto de la matriz y la exactitud del método FRAP-SIA se evaluaron mediante la recuperación de trolox en 8 muestras fortificadas con concentraciones de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ . La concentración de trolox fue elegida para obtener fortificaciones que no se encontraron en los extremos inferior y superior de la curva de calibración del método. Para determinar el porcentaje de recuperación para el método FRAP por microplaca, se optó por utilizar una concentración de trolox de  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  sobre la base de los mismos criterios descritos anteriormente.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para los métodos FRAP-SIA y FRAP-microplaca se presentan en la **tabla 2.14**. Se obtuvieron valores entre 94.66 - 114.22 % y 89.73 – 99.47 % para el método FRAP por SIA y microplaca, respectivamente. Al comparar los valores de recuperación por ambos métodos, el método FRAP-SIA presenta valores con distribución sin tendencia, ya que todos van del 94.66 al 114 %, pasando por el 100 % de recuperación. El método FRAP-microplaca tuvo una tendencia siempre por debajo del 100 %, lo que indica un posible error atribuido al método y no a las muestras analizadas, probablemente debido a que la mezcla del reactivo de FRAP y muestra no se homogeniza completamente en los pozos de la microplaca (por errores de pipeteo) y esto provoque una reacción poco exhaustiva

entre el reactivo de FRAP y la muestra, tendiendo a subestimar los valores de capacidad antioxidante.

**Tabla 2.14.** Porcentajes de recuperación de trolox por el método FRAP-SIA y FRAP-microplaca

| Muestras               | %Recuperación<br>FRAP-SIA <sup>a</sup> | % Recuperación<br>FRAP-microplaca <sup>b</sup> |
|------------------------|--|--|
| Vino tinto merlot      | 114.22                                 | 97.92  |
| Vino tinto carmenere   | 94.66                                  | 99.47  |
| Jugo de uva            | 100.80                                 | 91.17  |
| Jugo de arándano       | 108.31                                 | 89.73  |
| Jugo de uva-arándano   | 108.99                                 | 90.51  |
| Extracto de café honey | 104.22                                 | 91.50  |
| Extracto de té verde   | 94.88                                  | 91.50  |
| Extracto de tomate     | 107.85                                 | 90.29  |

<sup>a</sup>Muestras fortificadas con trolox 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; <sup>b</sup>muestras fortificadas con trolox 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 2.5.3 Precisión intermedia de ambos métodos SIA

El estudio de la precisión fue llevado a cabo inmediatamente después de establecer los parámetros de las curvas de calibración por ambos métodos SIA, sin embargo, debido a que se siguieron metodologías y tratamiento de datos similares, se decidió reportar los resultados en este apartado.

La precisión fue evaluada a partir de una muestra de vino (matriz compleja) y una disolución estándar de trolox (compuesto puro), con la finalidad de observar cuanta variabilidad puede tener la precisión del método, dependiendo del tipo de muestra analizada.

Los valores de capacidad antioxidante de las muestras y estándar empleados para determinar la precisión de los métodos ORAC-SIA y FRAP-SIA son mostrados en las **tablas A2.11 y A2.12 de los anexos**.

Empleando un ANOVA de los resultados de capacidad antioxidante, 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, permitiendo calcular los valores de repetibilidad obtenida en un mismo día (dentro de días) y la reproducibilidad intralaboratorio o precisión intermedia en varios días (entre días).

De esta manera, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio del método ORAC-SIA fueron de 1.96 y 2.60 % para el vino Carmenere, y 2.15 y 2.65 % para el estándar de trolox, respectivamente.

Para el método FRAP-SIA la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio fueron de 1.51 y 2.07 % para el vino merlot, así como 1.56 y 1.64 % para el estándar de trolox, respectivamente.

Dichos valores en ambos métodos son inferiores al 3 %, lo cual denota que presentan una buena precisión acorde con los criterios de la AOAC y el CODEX Alimentarius<sup>103,105</sup>.



## 2.6 CONCLUSIONES

- Los métodos propuestos para determinar capacidad antioxidante empleando los ensayos ORAC y FRAP son los primeros métodos de flujo reportados por SIA.
- El método ORAC-SIA presentó diversas ventajas, destacando la reducción de volúmenes de reactivos y muestra, disminución de la concentración del reactivo AAPH, minimización de errores de medición y reducción del tiempo de análisis por muestra. La temperatura de 70 °C en el reactor proporcionó una alta energía al sistema de reacción, reduciendo la energía de activación y aumentando la velocidad de reacción del método. De esta manera, el tiempo de reacción fue disminuido de 90 min por el método ORAC-microplaca a 5 min por el método ORAC-SIA, con una frecuencia de muestreo de 12 muestras alimenticias por hora.
- El desempeño cinético del sistema ORAC-SIA permitió un tratamiento de datos rápido y sencillo, midiendo las intensidades de los picos en lugar de las áreas. Además, dicho sistema mostró una excelente precisión y recuperaciones, coincidiendo con los valores de las normas internacionales y superando al método por microplacas en este rubro.
- El método FRAP-SIA ofreció ventajas como: una frecuencia de muestreo de 50 muestras por hora, un consumo de volumen total de 104  $\mu$ L (muestra y reactivo), una reducción del 30 % en la concentración del reactivo FRAP, y no requirió de un reactor ni tiempos de reacción de espera. Cada una de las características superó a lo reportado por Martins y colaboradores en 2013 en donde se propuso un método FRAP por FIA.
- Durante el desarrollo del método se identificó que el reactivo FRAP presentó inestabilidad debido a la precipitación cuando se utilizó durante más de 40 minutos después de su preparación. Por lo tanto, se propuso una mejora en el método de preparación del reactivo, disminuyendo el pH del medio, reemplazando la disolución amortiguadora de acetatos por una disolución de HCl, lo que permitió que el reactivo se utilizara hasta por 24 horas sin presentar precipitación.

- El método FRAP-SIA mejoró los errores por la manipulación de analistas, una barrera aún no superada en los métodos de microplacas (CV 18.5 %), destacando así el método FRAP-SIA propuesto con alta precisión. (CV<3 %).
- Finalmente, aunque la tasa de muestreo de los métodos ORAC y FRAP por microplaca es de 96 muestras por 90 y 30 min, respectivamente, el uso de los 96 pocillos dependerá de las necesidades de cada analista, ya que se requerirá el mismo tiempo de análisis para 1 muestra que para 96. De esta manera, los métodos ORAC-SIA y FRAP-SIA ofrecen un tiempo de análisis de 5 y 1.2 min por muestra, respectivamente, siendo una alternativa para cuantificar capacidad antioxidante con una alta precisión en contra parte con sus métodos por microplaca.

## CAPÍTULO III

### Método simultáneo para determinar capacidad antioxidante por SIA, empleando los ensayos ABTS y FRAP

#### 3.1 RESUMEN

Debido a la variabilidad en los mecanismos de reacción (TAH o TE) de los ensayos de capacidad antioxidante, se dificulta la comparación de los resultados entre ellos. Por ende, contar con una metodología única que pueda cuantificar la capacidad antioxidante a través de al menos dos ensayos con mecanismos distintos, facilitará una correlación rápida e interpretación coherente de los resultados obtenidos a partir de una misma muestra.

Este capítulo constituye la pieza central de la tesis, enfocado en el desarrollo de una metodología simultánea SIA con determinación multiparamétrica. El objetivo principal fue fusionar el ensayo FRAP-SIA (desarrollado en el capítulo 2), junto con el ensayo ABTS-SIA (reportado en la bibliografía), para unificarlos en una sola metodología simultánea. De esta manera, se describe en detalle la exploración de diversas alternativas para unificar los ensayos de capacidad antioxidante en un solo análisis, incluyendo los obstáculos superados durante este proceso.

Las diferencias entre ambos ensayos residieron en sus mecanismos de acción: el ensayo FRAP se fundamentó en un sistema de reacción redox, en el cual la partícula intercambiada fue un electrón; en contraste, el ensayo ABTS se basó en un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno.

Ambos ensayos presentan bondades como que sus reactivos pueden ser preparados tanto en medios acuosos como orgánicos. En el caso del ensayo FRAP, la estructura del reactivo está vinculada al grupo hemo presente en la hemoglobina y el ensayo está relacionado con un proceso de oxidación biológica. Por otro lado, en el ensayo ABTS se emplea un radical que no está naturalmente presente en sistemas biológicos, pero su notable estabilidad en diferentes valores de pH lo convierte en un ensayo adaptable a diversas circunstancias experimentales. Además, es importante señalar que ambos ensayos pueden ser fácilmente analizados por detectores espectrofotométricos debido a sus reacciones colorimétricas. Sin embargo, mientras que el ensayo FRAP intensifica su coloración a medida que aumenta la capacidad antioxidante, el ensayo ABTS muestra la

característica opuesta, disminuyendo su coloración. Esta diferencia los distingue aún más entre sí.

Es fundamental resaltar que la metodología propuesta no incluye una configuración con múltiples detectores, a diferencia de la mayoría de los métodos simultáneos por inyección en flujo. Además, constituye el primer trabajo documentado en determinar la capacidad antioxidante de manera simultánea por SIA sin la necesidad de acoplar el sistema a otra técnica analítica, como la cromatografía. Esta particularidad incrementa la facilidad del método y le confiere un valor añadido al demostrar la robustez inherente de los sistemas SIA por sí solos.

Finalmente, lo anterior descrito culmina en el desarrollo de un nuevo método denominado FRAP/ABTS-SIA con detección espectrofotométrica para evaluar la capacidad antioxidante, utilizando de forma simultánea los ensayos FRAP y ABTS. Este método se aplicó con éxito a muestras alimenticias, demostrando una impresionante tasa de muestreo de 30 muestras por hora, una configuración sencilla y tiempos de reacción breves. Su principal ventaja radica en la capacidad de medir la capacidad antioxidante mediante un solo análisis, empleando dos ensayos con detección espectrofotométrica a distintas longitudes de onda y con diferentes cinéticas de reacción. Los factores hidrodinámicos y químicos del método fueron optimizados mediante un diseño compuesto central, resultando en un caudal de  $40 \mu\text{L s}^{-1}$  y volúmenes de aspirado de 43-38-38-43  $\mu\text{L}$  para la secuencia (Antioxidante-FRAP-ABTS-Antioxidante). Esto implicó una reducción del 70 % en las concentraciones del reactivo de FRAP y del 50 % en el radical ABTS, en comparación con sus métodos por lotes. El método propuesto exhibió una excelente precisión ( $\text{DER} < 2 \%$ ) con un límite de detección de 0.031 3 y 0.004 7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para los ensayos FRAP y ABTS, respectivamente, con intervalo lineal de 10 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Se aplicó el método a diferentes alimentos como cafés, vinos, jugos y especias, obteniendo valores de capacidad antioxidante comparables con los métodos de referencia por microplaca. Por último, los valores de recuperación oscilaron entre 97.34 y 106.19 % para el ensayo FRAP, y entre 92.75 y 105.43 % para el ensayo ABTS.

## 3.2 OBJETIVOS

### GENERAL

Desarrollar, optimizar y validar una metodología para la determinación simultánea de capacidad antioxidante con los ensayos FRAP/ABTS, por análisis por inyección secuencial (SIA) con detección espectrofotométrica.

### ESPECÍFICOS

- Implementar el método ABTS-SIA con detección espectrofotométrica, para después fusionarlo con el método FRAP-SIA y desarrollar un único método simultáneo con ambos ensayos.
- Diseñar una configuración SIA que permita conjuntar el ensayo FRAP y ABTS con señales analíticas independientes, sin requerir más de un detector.
- Evaluar una secuencia de aspirado que permita el mezclado del bolo muestra con los bolos de reactivo de FRAP y radical ABTS<sup>••</sup> aspirados, para formar dos productos de reacción con señales (picos) independientes de cada ensayo y detectables por espectrofotometría.
- Establecer los parámetros químicos (concentraciones de los reactivos FRAP y ABTS), e hidrodinámicos (caudal y volúmenes de inyección) necesarios para que las reacciones en cada ensayo se lleven a cabo y permitan la cuantificación de capacidad antioxidante.
- Emplear un diseño de experimento de superficie de respuesta, para optimizar los factores concentración de reactivos, caudal y volúmenes de aspirado del método simultáneo propuesto.
- Calcular los parámetros estadísticos y de calidad (curva de calibración, límite de detección y cuantificación, precisión, exactitud y correlación con el método estándar) de cada ensayo a través del método simultáneo FRAP/ABTS-SIA.
- Aplicar el método simultáneo FRAP/ABTS-SIA a muestras alimenticias, para determinar valores de capacidad antioxidante, tanto por el ensayo FRAP como por ABTS.
- Comparar los valores de capacidad antioxidante de las muestras analizadas por el método FRAP/ABTS-SIA y por los métodos estándar de microplaca de FRAP y ABTS, para evaluar diferencias significativas entre ambos métodos.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

La importancia de determinar varios componentes en una única muestra ha ido en aumento debido a las crecientes demandas de análisis más rápidos y complejos<sup>106,107</sup>. Los métodos convencionales más empleados para el procesamiento de muestras previo a la medición de concentraciones de los analitos incluyen técnicas de separación clásicas como la cromatografía o las extracciones en fase sólida<sup>108,109</sup>. Estas técnicas abordan problemas significativos relacionados con la mejora de la selectividad en numerosas determinaciones, particularmente frente a la creciente complejidad de la matriz de la muestra. Las técnicas cromatográficas posibilitan la eficiente separación de una amplia gama de compuestos con diferentes propiedades en un solo análisis. Sin embargo, los métodos que conllevan una extracción de los analitos presentes en la muestra y luego una separación cromatográfica, demandan considerable tiempo y su frecuencia de muestreo típica no suele superar varias muestras por hora. Además, la instrumentación es costosa y genera una gran cantidad de información, que no siempre es necesaria para aplicaciones prácticas. Con el tiempo, se han desarrollado diversos métodos instrumentales que permiten la determinación simultánea de varios componentes en una muestra sin necesidad de separación previa<sup>110,111</sup>.

El término “determinación simultánea” en métodos de flujo fue introducido por primera vez en 1979 por Leif Anderson<sup>112</sup> cuando consiguió cuantificar nitratos y nitritos en muestras de agua de mar por FIA. Anderson empleó una configuración que inyectaba un volumen único de muestra que luego se dividía para mezclarse en dos corrientes portadoras de reactivo en paralelo conectadas a dos detectores espectrofotométricos, también en paralelo. A partir de entonces el concepto de determinaciones simultáneas en los métodos de flujo fue definido por la determinación de dos o más especies con una misma muestra mediante una misma configuración<sup>113,114</sup>. Esta alternativa es significativa y simplifica la automatización del procedimiento al eliminar los agentes de separación o de enmascaramiento convencionales.

Ha sido un desafío aplicar sistemas de análisis por flujo continuo para la determinación simultánea de varios componentes en volúmenes de muestra muy

reducidos (generalmente de decenas o cientos de microlitros). Esto se debe a la complejidad de adaptación, ya que los métodos por flujo involucran fenómenos de dispersión de muestra y reactivos, que pueden dificultar el análisis si no se controlan adecuadamente.

Es en este punto donde nace una nueva vertiente de los métodos de flujo llamado análisis por inyección en flujo multicomponente (MCFIA, por sus siglas en inglés), el cual introdujo mejoras en la frecuencia de muestreo, y aumentó la selectividad y sensibilidad de los sistemas de detección en flujo<sup>115</sup>.

En la literatura especializada se detallan distintos tipos de configuraciones de diversa complejidad para métodos multicomponente. La clasificación de los sistemas de análisis multicomponentes más comunes se basa en diferentes aspectos, como el número de especies a determinar, la cantidad de detectores empleados o el principio de inyección.

En estos sistemas multicomponente, se puede emplear un único detector o múltiples canales para analizar diversas especies. También, existe la posibilidad de que el sistema conste de varios detectores monocanal, cada uno destinado a determinar una especie específica. Este subgrupo se define como sistemas de multidetección. Además, la disposición relativa de los detectores en la configuración del sistema y sus características, como el principio de funcionamiento, la selectividad y la sensibilidad, pueden utilizarse como criterios secundarios.

En el primer caso, se puede distinguir la disposición de los detectores según estén dispuestos en serie o en paralelo. Otro criterio importante es el principio de inyección. Los sistemas pueden emplear dispositivos de inyección únicos o múltiples, ya sea de manera simultánea o secuencial, lo que se clasifica como multideterminación. En la literatura se encuentran descritos dispositivos de inyección de distintos niveles de complejidad, adaptados tanto para aplicaciones comunes como para aquellas más especializadas.

Inicialmente, los sistemas MCFIA se centraban exclusivamente en FIA, siendo ésta la técnica de flujo más relevante a mediados de los años 70's y principios de los 80's. Sin embargo, con el tiempo se incorporaron otras técnicas de flujo como SIA, MSFIA,  $\mu$ TAS, entre otras, ampliando así el espectro de métodos disponibles.

El análisis por inyección secuencial (SIA, por sus siglas en inglés) se distingue por su capacidad para aspirar, de forma secuencial, las cantidades necesarias de

muestras, reactivos y portador, almacenándolas en un mismo reservorio para posteriormente dispensarlas como un único bolo de reacción hacia un detector. Este avance ha facilitado la implementación de métodos simultáneos que posibilitan la aspiración de múltiples reactivos y muestras en una misma determinación. En la actualidad, se cuentan con múltiples principios aplicables a la detección simultánea por inyección secuencial, la mayoría de los cuales se fundamentan en la medición de doble pico<sup>116-118</sup>.

Por otra parte, los métodos espectrofotométricos más utilizados para medir la actividad antioxidante en muestras biológicas y alimenticias han sido los ensayos FRAP y ABTS, debido a que presentan ventajas como velocidades de reacción rápidas, miscibilidad de la muestra con el radical y sin el estricto control de temperatura. Estos ensayos han sufrido varias modificaciones desde su primera aparición como métodos en lote convencionales, hasta los más recientes métodos automatizados por analizadores de microplacas<sup>81,119</sup>. Además, se han planteado nuevas alternativas de cada ensayo como la producción directa de ABTS<sup>•+</sup> mediante la reacción con persulfato de potasio, para evitar la interferencia de los compuestos antioxidantes y prooxidantes en el proceso de generación del catión radical<sup>120</sup>.

En este sentido, la implementación de metodologías de flujo para la determinación de la actividad antioxidante en alimentos aún no está muy explotada, de tal modo que no existen datos bibliográficos sobre un método de flujo que conjunte más de un ensayo para determinar capacidad antioxidante. En consecuencia, el uso del SIA, es uno de los métodos de flujo predilecto por excelencia debido a que permite una manipulación más versátil de las muestras dentro de los tubos de flujo con posibles períodos de parada y marcha, así como posibilidad de adaptación para técnicas de múltiples reactivos y sistemas de múltiples detecciones, como los presentes en los métodos simultáneos antes descritos.

En este trabajo se desarrolló un novedoso método simultáneo para la determinación de capacidad antioxidante empleando los ensayos FRAP y ABTS. El objetivo de dicho método se centró en obtener dos señales (picos) que correspondieran al producto de reacción de cada ensayo. Esto se logró gracias a que se pudo establecer una secuencia de aspirado que permitió controlar la dispersión de los volúmenes de reactivos (ABTS y FRAP) y la muestra aspirados secuencialmente en una corriente portadora de agua.



El ensayo de FRAP se pudo llevar a cabo en serie junto con el ensayo ABTS a través del uso de un reactor conectado antes de llegar al detector. De esta manera, primero se aspiró el reactivo de FRAP y la muestra, y se enviaron al reactor para que se mezclaran y se mantuvieran ahí, mientras una segunda aspiración, ahora del reactivo ABTS y muestra, se llevaba a cabo, para luego ser enviados al mismo reactor donde se mantenían los primeros bolos aspirados, y así ser impulsado todo lo contenido en el reactor hasta el detector.

Lo anterior permitió primero, mezclar los bolos del reactivo FRAP y muestra a través de fenómenos de difusión, presentando una difusión radial y axial entre el bolo de FRAP y muestra proporcionada por los movimientos circulares del reactor y el caudal del flujo en continuo, y una difusión por gradiente presente por haber parado el flujo en el reactor al momento de aspirar ABTS y muestra.

Así mismo, se logró formar dos bolos de productos de reacción que fueran uno detrás del otro sin mezclarse entre sí, controlando la dispersión de ambos bolos a través de la longitud del reactor y los volúmenes aspirados de muestra y reactivos. En consecuencia, esto permitió una detección de continuo de dos señales (picos) propias de cada ensayo antioxidante.

### 3.4 METODOLOGÍA

#### 3.4.1 Reactivos y disoluciones

Se utilizaron los reactivos ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)), TPTZ (2,4,6-Tri-(2-piridil)-s-triazina),  $K_2S_2O_8$ ,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , HCl y el estándar de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Todos los reactivos fueron grado analítico y adquiridos de Sigma-Aldrich.

Se prepararon disoluciones acuosas de HCl a  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$  y  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , y  $K_2S_2O_8$  a  $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Todas las disoluciones fueron almacenadas en refrigeración a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por un periodo máximo de 15 días.

El reactivo de FRAP o complejo  $[Fe(TPTZ)_2]^{3+}$  fue preparado diariamente a partir de la mezcla de disoluciones de HCl a  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ , TPTZ a  $0.010 \text{ mol L}^{-1}$  (aforado con HCl  $0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ) y  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  a  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  en una proporción 10:1:1.

El radical  $ABTS^{•+}$  se preparó a partir de una disolución de ABTS a  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  que luego se mezclaron con  $K_2S_2O_8$  a  $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$  en una proporción 1:1 (volumen-volumen) y luego se almacenó por 12 h en ausencia de luz. Esta disolución se almacenó en frasco ámbar y refrigeración a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por un periodo máximo de 5 días.

La disolución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup> se preparó diariamente diluyendo a la mitad la disolución madre.

Se preparó una disolución madre de 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  trolox en agua destilada y se almacenó a 4 °C en oscuridad. A partir de ésta, se prepararon disoluciones estándar para construir curvas de calibración y todos los experimentos requeridos en el desarrollo y optimización de la metodología.

### 3.4.2 Muestras

Las muestras de alimentos analizadas fueron: jugos de arándano y granada, vinos tintos carmenere y merlot, granos de café (honey y lavado), té verde, especias de orégano, comino y romero. Todas las muestras fueron adquiridas de supermercados locales de la Ciudad de México.

Para los extractos de café, té, comino, orégano y romero, primero se pesaron 0.9 g de cada muestra (previamente molida) y se depositaron en 20 mL de agua destilada a 87 °C, bajo agitación magnética durante 5 min; posteriormente se filtró el extracto, se colectó y finalmente se llevó a un aforo de 25 mL. Todas las muestras se diluyeron en agua destilada.

### 3.4.3 Instrumentos y equipos

Se utilizó un equipo FIAlab SICrom. El equipo incorporó un bucle de espera con un volumen de 1 mL y un reservorio para disolución portadora de 4 mL. Se utilizaron tuberías de teflón con un diámetro interno de 0.70 mm.

El sistema de detección constó de dos fibras ópticas de 400  $\mu\text{m}$ , una celda de flujo Z (10 mm de paso óptico), una fuente de luz UV-Vis-NIR y un detector UV-Vis USB4000 de la marca Ocean Optics ajustado a 593 nm.

Todas las disoluciones y muestras fueron desgasificadas a través de un Baño de ultrasonido de la marca Branson.

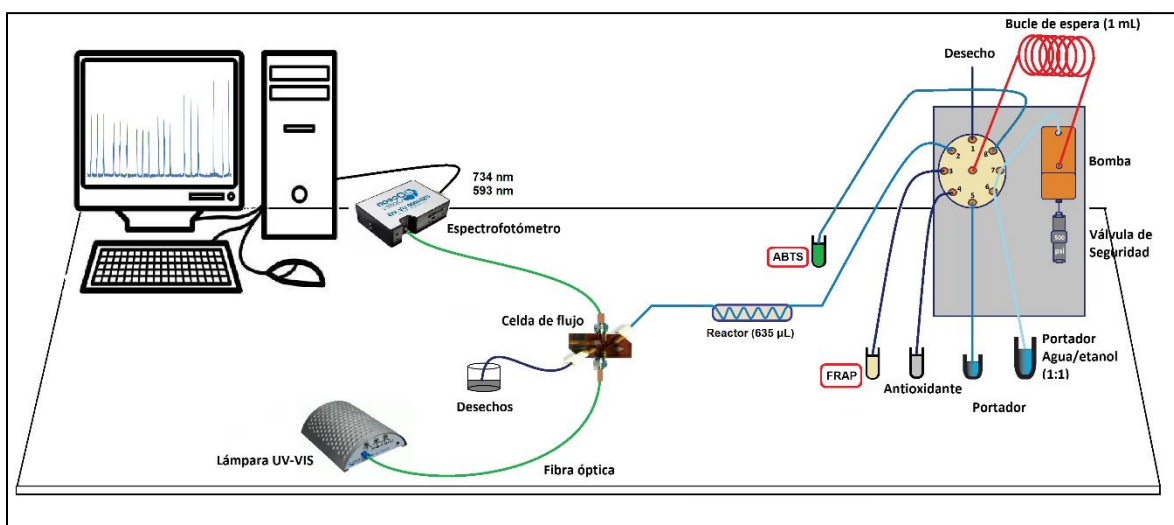
Se requirió el uso de una parrilla con agitación de la marca CIMAREC para la extracción de muestras por agitación magnéticas con temperatura controlada.

Para los métodos de capacidad antioxidante por microplacas, se utilizó un lector de microplaca Biotek Synergy HT de un solo canal, integrado con un monocromador y control de temperatura.

### 3.4.4 Procedimiento del método

Antes de conjuntar los ensayos FRAP y ABTS en un sistema SIA simultáneo, es indispensable conocer que, mientras el ensayo FRAP se fundamenta en la reducción de un complejo de Fe (III) a Fe(II), el ensayo ABTS estabiliza un radical catiónico por medio de la transferencia de un átomo de carbono. Ambos ensayos son monitoreados con detectores espectrofotométricos debido a que sus reacciones involucradas son coloridas. Sin embargo, mientras que el ensayo FRAP intensifica su coloración a medida que aumenta la capacidad antioxidante, el ensayo ABTS muestra la característica opuesta, disminuyendo su coloración.

La **figura 3.1** muestra la representación esquemática del sistema SIA para determinar capacidad antioxidante con detección espectrofotométrica empleando los ensayos ABTS y FRAP de manera simultánea (FRAP/ABTS-SIA).



**Figura 3.1.** Configuración del sistema FRAP/ABTS-SIA

Los ensayos FRAP y ABTS se lograron conjuntar en un solo análisis simultáneo a través del uso de un reactor con volumen de 635 µL conectado antes de llegar al detector. El sistema SIA permitió dividir el análisis en dos pasos cruciales: 1) primero se aspiraron volúmenes de reactivo de FRAP y muestra, y se enviaron inmediatamente al reactor para que se mezclaran y reaccionaran, manteniéndose ahí, mientras que 2) se aspiraban volúmenes de reactivo ABTS y muestra, para luego ser enviados al mismo reactor donde se mantenía el producto de reacción entre el reactivo de FRAP y muestra, y finalmente enviar los dos bolos de producto de reacción de ambos ensayos hacia el detector.

Con base en lo anterior, se desarrolló la programación mostrada en la **tabla 3.1**, la cual describe la secuencia de pasos del método FRAP/ABTS-SIA optimizado.

Inicialmente el portador de agua destilada (paso 1) llenó la bomba del equipo hasta un volumen de 3 mL; luego, 43  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar y 38  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP se aspiraron secuencialmente en el bucle de espera y enseguida se dispensaron al reactor junto con agua hasta completar un volumen de 600  $\mu\text{L}$  (pasos 2-4). A continuación, se aspiraron secuencialmente 38  $\mu\text{L}$  del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , 43  $\mu\text{L}$  de muestra o el estándar y 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada en bucle de espera (pasos 5-7). Finalmente, se dispensó el contenido del reactor y del bucle de espera hacia la celda de flujo acoplada al detector configurado a 595 y 734 nm (paso 8).

**Tabla 3.1.** Programación del sistema FRAP/ABTS-SIA

| Paso | Acción  | Puerto | Descripción  | Caudal ( $\mu\text{L/s}$ ) | Dirección de flujo | Tiempo (s) |
|------|---|--------|--|----------------------------|--------------------|------------|
| 1    | Llenado de bomba con el portador              | 6-7    | La bomba es llenada con 3 mL de agua destilada   | 100                        | Inverso            | 30         |
| 2    | Aspirado de antioxidante                      | 4      | Se aspira 43 $\mu\text{L}$ del antioxidante al bucle de espera                                     | 80                         | Inverso            | 0.54       |
| 3    | Aspirado de reactivo de FRAP                  | 3      | Se aspira 38 $\mu\text{L}$ de disolución FRAP al bucle de espera                                   | 80                         | Inverso            | 0.48       |
| 4    | Dispensado hacia el reactor                   | 2      | Se dispensa 600 $\mu\text{L}$ al detector  | 80                         | Hacia delante      | 7.5        |
| 5    | Aspirado del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ | 8      | Se aspira 38 $\mu\text{L}$ de disolución $\text{ABTS}$ al bucle de espera                          | 80                         | Inverso            | 0.48       |
| 6    | Aspirado de antioxidante                      | 4      | Se aspira 43 $\mu\text{L}$ del antioxidante al bucle de espera                                     | 80                         | Inverso            | 0.54       |
| 7    | Aspirado de portador                          | 5      | Se aspira 100 $\mu\text{L}$ de agua al bucle de espera.  | 100                        | Inverso            | 1          |
| 8    | Dispensado hacia el detector*                 | 2      | Se dispensa 2 662 $\mu\text{L}$ del bucle de espera y la bomba, al detector pasando por el reactor | 40                         | Hacia delante      | 66.5       |

\*Espectrofotómetro configurado a 593 y 734 nm.

#### 3.4.4.1 Cálculo de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante por el ensayo FRAP, fue calculada bajo los mismos criterios del método FRAP-SIA descrito en el capítulo 2 y empleando la ecuación 2.3. Para determinar la capacidad antioxidante por el ensayo ABTS, usualmente se suele medir la decoloración del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (disminución de absorbancia) por la

reacción con un antioxidante, sin embargo, la variable de respuesta también se puede expresar en términos de absorbancias en aumento con la finalidad de obtener una pendiente positiva al construir curvas de calibración. Por tanto, se midió la absorbancia del radical ABTS<sup>•+</sup> antes ( $A_0$ ) y después ( $A_s$ ) de reaccionar con la muestra o estándar. Después, se calcularon los valores de  $A_{ABTS}$  a partir de la resta de  $A_0$  menos  $A_s$  (Ec. 3.2).

$$A_{ABTS} = A_0 - A_s \quad \text{Ec. 3.2}$$

Los valores de  $A_{ABTS}$  fueron interpretados como respuesta analítica del método, durante todo el proceso de optimización y validación.

Ambos ensayos emplearon sus respectivos valores de absorbancia para elaborar curvas de calibración, expresando los valores de capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalente del estándar trolox.

### 3.4.5 Estudios previos a la optimización

#### 3.4.5.1 Implementación del ensayo ABTS-SIA

Debido a que el objetivo del presente trabajo es conjuntar los ensayos FRAP y ABTS en un solo análisis por SIA, fue indispensable conocer las condiciones de análisis del método ABTS por SIA, sin embargo, aunque esta metodología ya había sido desarrollada y publicada<sup>121</sup>, se decidió modificar el método y proponer una programación distinta a lo reportado, pero similar al método FRAP-SIA desarrollado en el capítulo 2. Esto con la finalidad de mejorar el método en el sentido de reducir los tiempos de análisis y que compartiera una configuración similar al método FRAP-SIA.

Así, en primer lugar, se preparó una disolución de radical ABTS<sup>•+</sup> mezclando disoluciones de ABTS a  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  y  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$  en una proporción 1:1 (volumen-volumen) con un tiempo de formación del radical de 12 h en ausencia de luz.

Siguiendo la programación de la **tabla 3.2**, se realizó un primer análisis para observar si la reacción del ensayo ABTS se llevaba a cabo.

**Tabla 3.2.** Programación del sistema SIA para determinar capacidad antioxidante solamente por el ensayo ABTS

| Paso | Acción                           | Puerto | Descripción  | Caudal ( $\mu\text{L s}^{-1}$ ) | Dirección de flujo | Tiempo (s) |
|------|----------------------------------|--------|--|---------------------------------|--------------------|------------|
| 1    | Llenado de bomba con el portador | 6-7    | La bomba es llenada con 1.5 mL de agua destilada                           | 100                             | Inverso            | 15         |
| 2    | Aspirado de disolución ABTS      | 3      | Se aspira 33 $\mu\text{L}$ de disolución ABTS al bucle de espera           | 70                              | Inverso            | 0.47       |
| 3    | Aspirado de antioxidante         | 4      | Se aspira 38 $\mu\text{L}$ del antioxidante al bucle de espera             | 70                              | Inverso            | 0.54       |
| 4    | Aspirado de disolución ABTS      | 3      | Se aspira 33 $\mu\text{L}$ de disolución ABTS al bucle de espera           | 70                              | Inverso            | 0.47       |
| 5    | Aspirado de portador             | 5      | Se aspira 110 $\mu\text{L}$ de agua al bucle de espera con 1 s de espera   | 50                              | Inverso            | 3.2        |
| 6    | Dispensado hacia el detector*    | 2      | Se dispensa 100 $\mu\text{L}$ al detector y se espera 20 s                 | 20                              | Hacia delante      | 25         |
| 7    | Dispensado hacia el detector     | 2      | Se dispensa 1614 $\mu\text{L}$ del bucle de espera y la bomba, al detector | 35                              | Hacia delante      | 46         |

\*Espectrofotómetro configurado a 734 nm.

Se propusieron dos reacciones entre el radical  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  (diluido 1:5 y 1:10) frente a un estándar de trolox de  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ , así como la medición de sus respectivos blancos.

Posterior a verificar que el método ABTS-SIA presentó una reacción indicativa de que el ensayo se realizó con éxito, se procedió a construir una curva de calibración con concentración de trolox de 10 a  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  con la finalidad de conocer los parámetros de regresión del método.

### 3.4.5.2 Evaluación de las señales analíticas del método FRAP/ABTS-SIA

Como punto de partida para desarrollar una configuración SIA que permitiera conjuntar los ensayos FRAP y ABTS en un solo análisis, se propusieron diversos experimentos enfocados en la elección de una secuencia de aspirado que permitiera realizar las reacciones involucradas en cada ensayo y que se produjeran señales analíticas (picos) separadas de cada ensayo. Es importante destacar, que primero se evaluaron secuencias de aspirado sin involucrar un reactor en la configuración. En consecuencia, como parte de los estudios preliminares se plantearon 4 diferentes secuencias mostradas en la **tabla 3.3** para desarrollar el método

simultáneo. Las disoluciones de reactivo de FRAP y radical ABTS<sup>•+</sup> se prepararon como se describe en el apartado de reactivos y disoluciones, sin realizar diluciones. Cada ensayo se evaluó frente a un estándar de trolox en un intervalo de concentraciones de 10 a 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Estas secuencias fueron realizadas siguiendo una programación similar a la descrita en la **tabla 3.1**, con una detección a 593 y 734 nm. Cada secuencia fue planteada a partir la fusión de las programaciones de cada ensayo por SIA.

**Tabla 3.3.** Evaluación de secuencias de aspirado para desarrollar el método simultáneo FRAP/ABTS-SIA

| Experimentos | Secuencia de aspirado   | Volumen aspirado ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------------|---|------------------------------------|
| 1            | FRAP–Antioxidante–FRAP–H <sub>2</sub> O–ABTS–Antioxidante–ABTS–H <sub>2</sub> O | 33-38-33-110-33-38-33-110          |
| 2            | ABTS–Antioxidante–ABTS–H <sub>2</sub> O–FRAP–Antioxidante–FRAP–H <sub>2</sub> O | 33-38-33-110-33-38-33-110          |
| 3            | FRAP–Antioxidante–H <sub>2</sub> O–Antioxidante–ABTS                            | 33-38-110-38-33                    |
| 4            | ABTS–Antioxidante–H <sub>2</sub> O–Antioxidante–FRAP                            | 33-38-110-38-33                    |

Después de evaluar las secuencias descritas en la **tabla 3.3** sin el uso de un reactor, se decidió modificar la configuración del sistema SIA, incluyendo en esta ocasión un reactor de 635  $\mu\text{L}$  antes de la salida al detector. De esta manera se propuso una nueva configuración SIA para evaluar las reacciones implícitas en los ensayos FRAP y ABTS. La programación empleada fue similar a la mostrada en la **tabla 3.1**, con una secuencia de aspirado **antioxidante–FRAP–antioxidante–ABTS<sup>•+</sup>** con volúmenes de aspirado de **38–33–38–33  $\mu\text{L}$** , respectivamente, y un caudal de salida al detector de 35  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Las disoluciones de reactivo de FRAP y radical ABTS<sup>•+</sup> se prepararon como se describe en el apartado de reactivos y disoluciones, diluyendo únicamente al radical ABTS<sup>•+</sup> en una proporción 1:5 con agua destilada.

Inicialmente se realizó una reacción de capacidad antioxidante entre el reactivo FRAP, el radical ABTS<sup>•+</sup> y el estándar trolox con concentraciones de 20 a 140  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , registrando los blancos de reacción tanto para el reactivo FRAP como para el radical ABTS<sup>•+</sup> a 593 y 734 nm, respectivamente. Finalmente, se reportaron las absorbancias de los ensayos FRAP y ABTS como se indica en el apartado de cálculo de capacidad antioxidante.

### 3.4.6 Optimización del método FRAP/ABTS-SIA

#### 3.4.6.1 Evaluación del orden de aspirado de la programación secuencial

Después de establecer las condiciones de reacción de los ensayos FRAP y ABTS, y elegir una programación que permitiera efectuar dichos ensayos de manera simultánea y con señales analíticas (picos) separadas, se propuso optimizar la secuencia preliminar en función del orden de aspirado. Se consideraron como variable de respuesta las absorbancias de cada ensayo ( $A_{\text{FRAP}}$  y  $A_{\text{ABTS}}$ ), teniendo como objetivo identificar el orden de aspirado que proporcionara los mayores valores de capacidad antioxidante. En la **tabla 3.4** se muestran las combinaciones de las secuencias evaluadas (con distinto orden de aspirado), así como sus respectivos volúmenes, al usar un estándar de trolox a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para estos experimentos se usó la programación de la **tabla 3.1**, con un caudal de salida al detector de  $35 \mu\text{L s}^{-1}$ . El reactivo FRAP se preparó como se describe al inicio y sin diluir, por otro lado, el radical ABTS $^{\bullet+}$  se diluyó en proporción 1:5.

**Tabla 3.4.** Experimentos para la elección de la secuencia de aspirado

| Experimentos | Secuencia de aspirado                | Volumen aspirado ( $\mu\text{L}$ ) |
|--------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1            | FRAP–Antioxidante-ABTS-Antioxidante  | 33-38-33-38                        |
| 2            | Antioxidante-FRAP-Antioxidante-ABTS  | 38-33-38-33                        |
| 3            | FRAP–Antioxidante-Antioxidante-ABTS  | 33-38-38-33                        |
| 4            | Antioxidante-FRAP-ABTS-Antioxidante  | 38-33-33-38                        |
| 5            | ABTS-Antioxidante-FRAP–Antioxidante  | 33-38-33-38                        |
| 6            | Antioxidante-ABTS-Antioxidante-FRAP  | 38-33-38-33                        |
| 7            | ABTS-Antioxidante-Antioxidante-FRAP  | 33-38-38-33                        |
| 8            | Antioxidante-ABTS- FRAP–Antioxidante | 38-33-33-38                        |

#### 3.4.6.2 Optimización de parámetros hidrodinámicos y químicos

Se desarrolló un diseño compuesto central dividido en 3 bloques y con 3 puntos centrales por bloque, dando un total de 33 experimentos. Los factores evaluados en el diseño fueron el volumen de aspirado de muestra y reactivos, el caudal de salida al detector y las concentraciones de los reactivos FRAP y ABTS $^{\bullet+}$ . Se utilizó como variable de respuesta del diseño, las absorbancias correspondientes para cada ensayo ( $A_{\text{FRAP}}$  Y  $A_{\text{ABTS}}$ ). Los experimentos fueron realizados empleando una disolución de trolox a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  como estándar antioxidante.



Con la finalidad de reducir la experimentación, los volúmenes de aspirado de muestra y del reactivo FRAP se consideraron un solo factor según su secuencia de aspirado, esto quiere decir todos los volúmenes de la secuencia **antioxidante-FRAP-antioxidante-ABTS<sup>••</sup>** se evaluaron al mismo tiempo a los niveles del diseño. Por otro lado, la concentración del reactivo FRAP fue manejado en términos de porcentaje de su preparación, por lo tanto, al preparar dicho reactivo en proporciones 10:1:1 con HCl (0.005 mol L<sup>-1</sup>): TPTZ (10 mmol L<sup>-1</sup>): FeCl<sub>3</sub> (20 mmol L<sup>-1</sup>) se consideró como una concentración al 100 %. La concentración del radical ABTS<sup>••</sup> también se expresó en términos de porcentaje, siendo el radical ABTS<sup>••</sup> sin ninguna dilución el 100 %. La **tabla 3.5** muestra los valores bajos y altos para cada factor del diseño compuesto central.

**Tabla 3.5.** Diseño compuesto central en 3 bloques con 3 puntos centrales por bloque, para optimizar el sistema FRAP/ABTS-SIA

| Factores  | Nivel bajo  | Nivel alto  |
|---|-------------|-------------|
| Concentración del reactivo FRAP (%)   | 80          | 100         |
| Concentración del radical ABTS <sup>••</sup> (%)                              | 20          | 50          |
| Volumen de aspirado en $\mu\text{L}$<br>(Antioxidante-FRAP-ABTS-Antioxidante) | 28-23-23-28 | 38-33-33-38 |
| Caudal ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )   | 25          | 35          |
| Experimentos totales  | 33          |             |

### 3.4.7 Características del método

Una vez seleccionadas las mejores condiciones hidrodinámicas (caudal y volumen de aspirado de muestras y reactivos) y químicas (concentraciones de reactivos) del método FRAP/ABTS-SIA a través de los diseños de experimentos, se calcularon parámetros de intervalo lineal de la curva de calibración, límite de detección y cuantificación, precisión, recuperaciones y correlación con los métodos de referencia. Para todos los experimentos se utilizó el estándar de trolox como antioxidante, reportando de esta manera resultados de la capacidad antioxidante en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalente de trolox.

#### 3.4.7.1 Curvas de calibración

Es fundamental señalar que, a pesar de que el método FRAP/ABTS-SIA mide la capacidad antioxidante de una muestra mediante dos ensayos simultáneos, es

necesario generar una curva de calibración independiente para cada uno de estos ensayos con el fin de determinar dicha capacidad antioxidante.

Tomando en cuenta lo anterior, se propusieron la construcción de dos curvas de calibración, una para cada ensayo, ambas con un intervalo de concentraciones de 5 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  empleando el estándar de trolox.

El análisis de datos se realizó calculando las  $A_{\text{FRAP}}$  y  $A_{\text{ABTS}}$  respectivas de cada ensayo, después se graficaron estas absorbancias frente a cada concentración empleada del estándar. Cinco curvas de calibración por cada ensayo fueron construidas por un periodo de cinco días (una curva por día), para así obtener una curva promedio para cada ensayo a partir de ellas. Los límites de detección y cuantificación se estimaron considerando la desviación estándar de la regresión lineal ( $Sy/x$ ) y la pendiente ( $b$ ) de la curva de calibración promedio<sup>88</sup>.

#### **3.4.7.2 Precisión intermedia**

La precisión del método propuesto fue evaluada en términos de reproducibilidad y repetibilidad dentro del laboratorio, para lo cual se prepararon por duplicado, durante cinco días disoluciones acuosas de trolox a 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y una muestra de extracto de café honey al 0.5 % (m/v). Ambas disoluciones fueron aspiradas por triplicado a las condiciones óptimas del sistema, y se les midió la capacidad antioxidante (expresado en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox), mediante la interpolación de una curva de calibración promedio previamente descrita para cada ensayo. Para determinar la repetibilidad y reproducibilidad se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor<sup>92,93</sup> y se calcularon las desviaciones estándar asociadas a cada parámetro.

#### **3.4.7.3 Ensayos FRAP y ABTS por microplaca**

Con la finalidad de comparar los resultados de capacidad antioxidante determinados por el método simultáneo propuesto y los métodos de referencia de cada ensayo, se realizaron las metodologías por microplaca para los ensayos FRAP y ABTS. Se utilizaron disoluciones acuosas de trolox de 5 a 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para la curva de calibración del ensayo ABTS y concentraciones de 5 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para la curva de calibración del ensayo FRAP.

El procedimiento del ensayo FRAP en microplaca se realizó de acuerdo con lo reportado en la literatura con ligeras modificaciones<sup>91</sup>. En una microplaca de 96

pozos fueron dispensados 280  $\mu\text{L}$  del reactivo de FRAP y 20  $\mu\text{L}$  de la muestra o estándar por cada pozo, obteniendo de esta manera un volumen total de 300  $\mu\text{L}$ . El análisis se realizó a temperatura ambiente y las lecturas de absorbancia se leyeron a una longitud de onda de 593 nm después de 30 min.

Para el ensayo ABTS, el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  fue diluido en una proporción 1:15 hasta alcanzar una absorbancia cercana a la unidad. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos fueron dispensados 150  $\mu\text{L}$  del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  y 150  $\mu\text{L}$  de la muestra o estándar por cada pozo, obteniendo un volumen total de 300  $\mu\text{L}$  <sup>119</sup>. El análisis se realizó a temperatura ambiente y las lecturas de absorbancia se leyeron a una longitud de onda de 734 nm después de 15 min.

Los blancos de reacción se prepararon utilizando agua destilada en lugar de la muestra o estándar. El análisis de datos fue realizado calculando los valores de  $A_{\text{FRAP}}$  y  $A_{\text{ABTS}}$ . En adición, las curvas de calibración fueron construidas graficando las concentraciones del estándar de trolox contra las  $A_{\text{FRAP}}$  y  $A_{\text{ABTS}}$ . De esta manera, para cada muestra analizada, los valores de capacidad antioxidante fueron referidos en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalentes del estándar trolox.

#### 3.4.7.4 Estudio de recuperación

Con la finalidad de estimar la exactitud del método y evaluar el efecto matriz, se determinaron porcentajes de recuperación de trolox en 10 muestras fortificadas con el estándar.

Primero se procedió a la evaluación por triplicado de la capacidad antioxidante de diversas muestras, previamente diluidas en agua destilada. Éstas incluyeron vinos tintos Merlot y Carmenere (0.25 % (v/v) cada uno), jugos de arándano (2.50 % (v/v)) y granada (0.45 % (v/v)), además de extractos de café Honey y Lavado (0.57 % (v/v) cada uno), té verde (0.2 % (v/v)), orégano (0.63 % (v/v)), comino (4 % (v/v)) y romero (1.25 % (v/v)). Después de conocer la capacidad antioxidante de las muestras, se prepararon disoluciones fortificadas de cada muestra adicionando 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  del estándar de trolox y nuevamente se midió la capacidad antioxidante.

El cálculo del porcentaje de recobro se realizó mediante la división de la diferencia en la capacidad antioxidante entre la muestra fortificada y la muestra no fortificada, entre la concentración de trolox agregada, seguido por la multiplicación del resultado por 100<sup>92,93</sup>.

### 3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.5.1 Estudios previos a la optimización

##### 3.5.1.1 Implementación del ensayo ABTS-SIA

Debido a que el objetivo de este trabajo es conjuntar los ensayos FRAP y ABTS en una sola metodología por SIA, fue indispensable implementar el ensayo ABTS por SIA y mejorar las condiciones de reacciones implícitas, de tal forma que la metodología fuera más rápida y presentara una buena sensibilidad. En adición se adecuó la programación de la metodología ABTS-SIA lo más similar posible a la metodología del método FRAP-SIA previamente optimizada (Capítulo 2), con la finalidad de facilitar la fusión de ambos ensayos con una misma programación.

En la **figura 3.2** se muestra un FIAGrama con las señales resultantes de las reacciones evaluadas entre el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> a dos niveles de concentración y el estándar de trolox a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 734 nm, así como sus respectivos blancos. En dichas señales, se logra apreciar que cuando se emplea el ABTS<sup>•+</sup> diluido 10 veces sin reaccionar con trolox, la señal registra una absorbancia máxima de  $0.492 \pm 0.017$  y cuando se diluye 5 veces la absorbancia aumenta a  $0.973 \pm 0.006$ . Por otro lado, cuando el estándar de trolox reacciona con el ABTS<sup>•+</sup> a las dos diluciones usadas, las absorbancias decaen casi por completo registrando valores de  $0.024 \pm 0.006$  y  $0.028 \pm 0.004$ , para diluciones de 1:5 y 1:10, respectivamente.

Lo anterior mostró que el ensayo ABTS se llevó a cabo con éxito, debido a que dicho ensayo se fundamenta en una reacción entre el radical ABTS<sup>•+</sup> frente a un antioxidante, entonces, el grado de reacción se asocia a la capacidad que tiene el antioxidante de transferirle un átomo de hidrógeno para estabilizar al radical y a su vez disminuir su coloración. Por lo tanto, se puede interpretar que a mayor decoloración del radical ABTS<sup>•+</sup>, mayor capacidad antioxidante tiene una muestra. De esta manera, al observar un decaimiento en la señal con respecto al blanco, se puede asegurar que el ensayo ABTS se llevó a cabo con éxito.

En cuanto a las dos diluciones empleadas del radical, se observó que la dilución 1:5 fue la que mostró una señal con absorbancia cercana a la unidad, lo cual nos permite tener un mayor intervalo de decaimiento de la señal y también reducir los errores de medición de los picos. En contraparte, al usar una dilución 1:10, la señal

del radical disminuye a la mitad y esto puede dificultar las mediciones de los picos al tener un intervalo de decaimiento reducido.

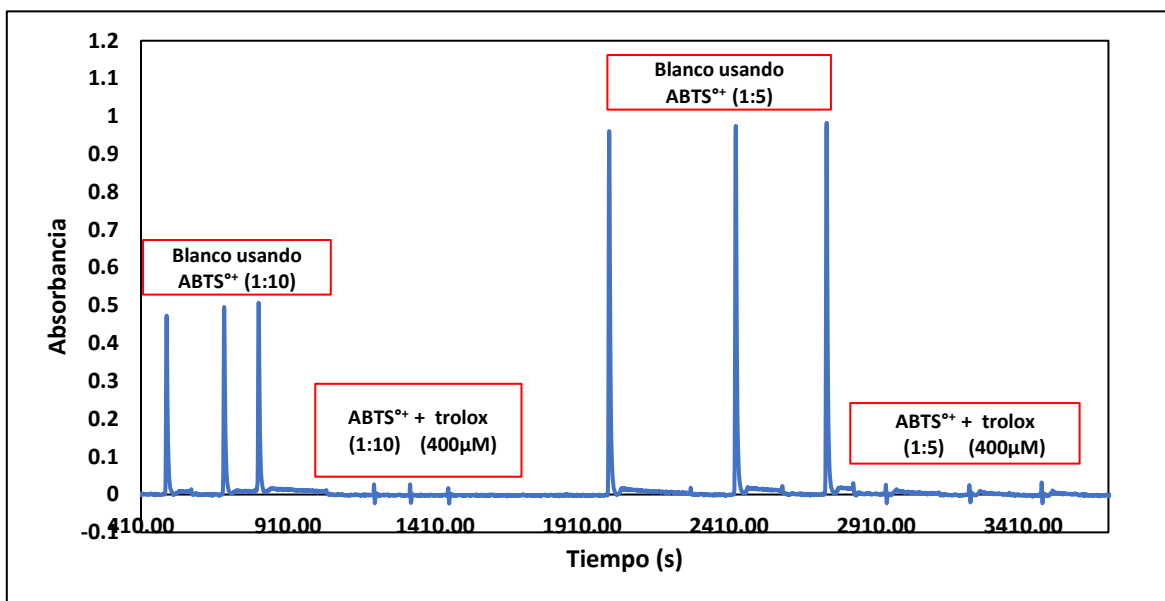
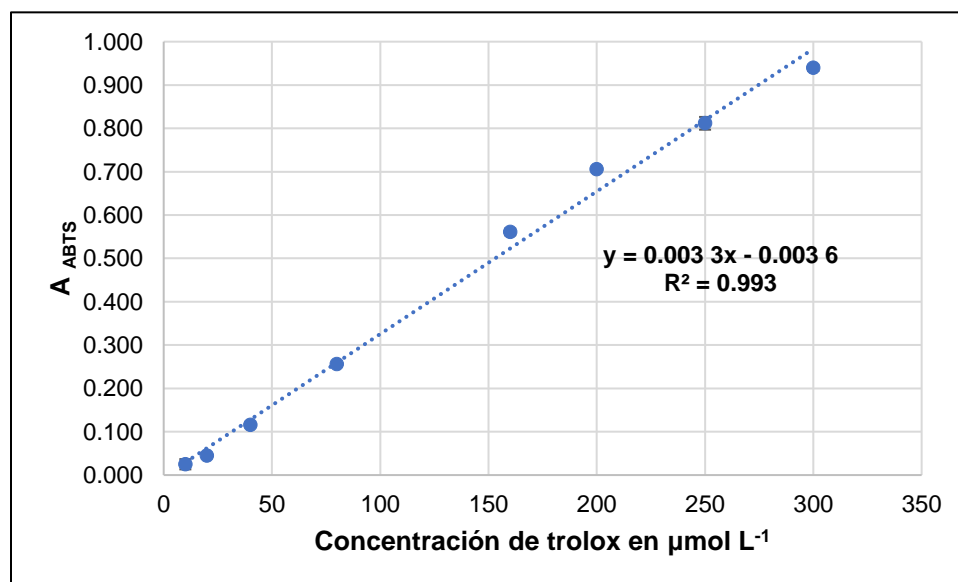


Figura 3.2. FIagrama de las señales de reacción del método ABTS por SIA, empleando un estándar de trolox a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$

Se construyó una curva de calibración del ensayo ABTS-SIA usando al radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  con una dilución 1:5 y el estándar de trolox en un intervalo de 10 a  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ , cada punto de la curva fue inyectado por triplicado en el equipo. Dicha curva es mostrada en la **figura 3.3** y mostró una buena linealidad con un coeficiente de correlación de 0.996 5.



**Figura 3.3.** Curva de calibración del método ABTS por SIA, empleando un estándar de trolox en un intervalo de 10 a 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$

### 3.5.1.2 Evaluación de la señal del sistema FRAP/ABTS-SIA

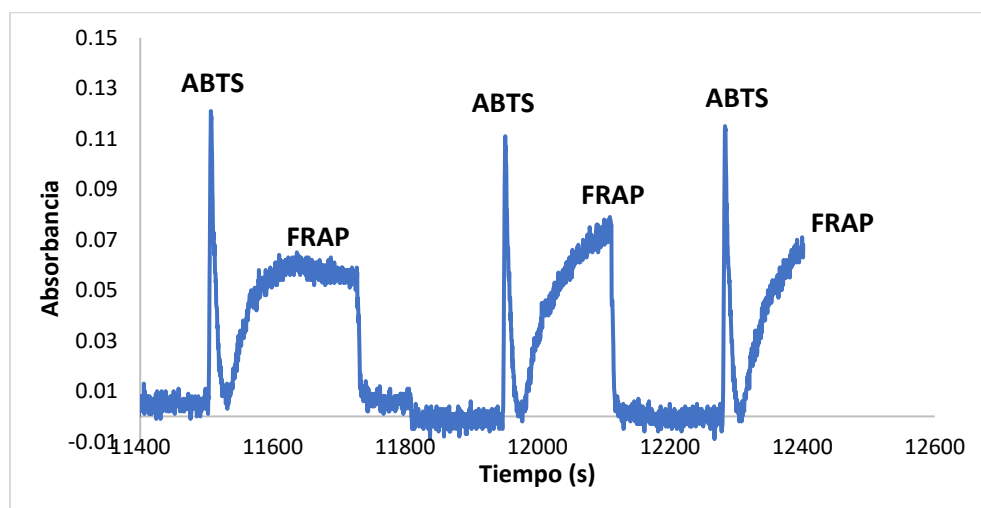
#### *Señales sin dispersión controlada*

Antes de presentar los resultados de los experimentos en este apartado, es crucial resaltar dos aspectos fundamentales. En primer lugar, el enfoque principal del método simultáneo fue la obtención de dos señales distintas (picos) en cada ensayo, centrándose exclusivamente en medir las alturas máximas de dichos picos para el tratamiento de los datos. En segundo lugar, el espectrofotómetro empleado permitió realizar el análisis a dos longitudes de onda al mismo tiempo. Sin embargo, aunque el radical ABTS<sup>•+</sup> absorbe a 734 nm y el reactivo de FRAP a 593 nm, el radical ABTS<sup>•+</sup> también puede detectarse a 593 nm, a diferencia del reactivo de FRAP, que no es perceptible a 734 nm. Esto resulta conveniente ya que permitió usar una sola longitud de onda (593 nm) para monitorear ambos ensayos en las primeras experimentaciones antes de la optimización y validación.

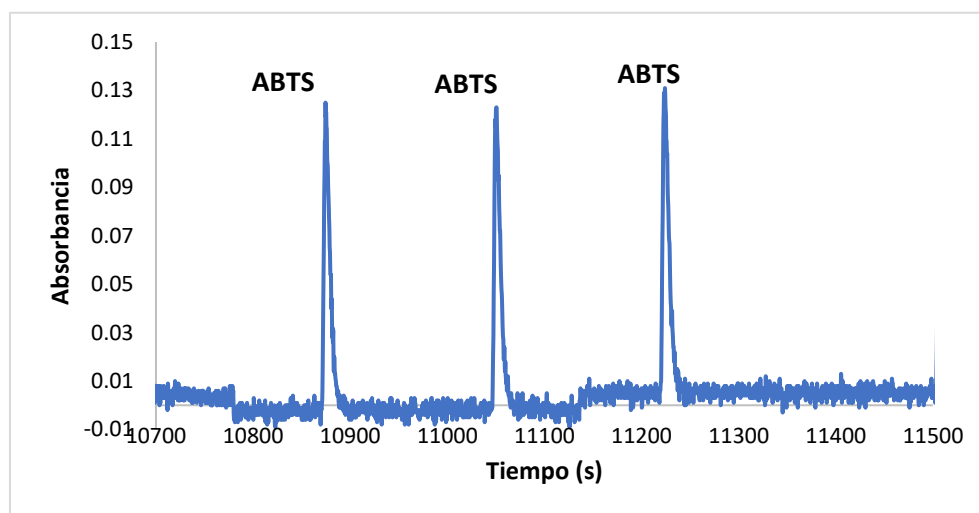
Las señales analíticas de los resultados correspondientes a los 4 experimentos propuestos en la **tabla 3.3** de la metodología, presentaron ciertas irregularidades descritas a continuación: los experimentos 1 y 2 presentaron solo un pico definido en lugar de dos (uno por cada ensayo), esto probablemente se debió a que en ambos experimentos la secuencia de aspirado fue demasiado larga, imposibilitando controlar la dispersión de los bolos de producto de reacción de cada ensayo.

Para ambos experimentos se reprodujeron de manera idéntica las secuencias y volúmenes empleados que en los métodos independientes FRAP-SIA y ABTS-SIA, siendo separados únicamente por un volumen de 110  $\mu\text{L}$  de agua entre cada secuencia. De esta manera, el experimento 1 solo se diferenció en el hecho de que primero se aspira una secuencia propia del ensayo FRAP y después la secuencia correspondiente al ensayo ABTS. Sin embargo, es importante puntualizar que en los sistemas SIA, el primer volumen de reactivo que se aspira es el último que llega al detector, ya que se invierte el flujo. En la **figura 3.4** se muestra la señal correspondiente al experimento 1 cuando se evaluó con trolox a 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  monitoreado a 593 nm. En este experimento (secuencia **FRAP–Antioxidante–FRAP–H<sub>2</sub>O–ABTS–Antioxidante–ABTS–H<sub>2</sub>O**) el pico que presentó irregularidad en su forma fue del ensayo FRAP, ya que el bolo se dispersó tanto que no logró

salir por completo del detector. Esto pudo ser corroborado gracias a que también se analizó un blanco en donde no hubiera presencia de reactivo FRAP (secuencia  $\text{H}_2\text{O}$ –Antioxidante– $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{H}_2\text{O}$ –ABTS–Antioxidante–ABTS– $\text{H}_2\text{O}$ ), dando como resultado solo una señal del ensayo ABTS como se muestra en la **figura 3.5**. Los experimentos 2, 3 y 4 presentaron el mismo efecto de dispersión, variando únicamente el orden de aparición del pico de cada ensayo.



**Figura 3.4.** FIAgrama del experimento 1 (secuencia FRAP–Antioxidante–FRAP– $\text{H}_2\text{O}$ –ABTS–Antioxidante–ABTS– $\text{H}_2\text{O}$ ) empleando trolox a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$



**Figura 3.5.** FIAgrama del blanco del experimento 1 (secuencia  $\text{H}_2\text{O}$ –Antioxidante– $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{H}_2\text{O}$ –ABTS–Antioxidante–ABTS– $\text{H}_2\text{O}$ ) empleando trolox a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$

### **Señales con dispersión controlada**

De esta manera se optó por introducir un reactor antes de la salida al detector con la finalidad de poder separar los productos de reacción de cada ensayo y que no se mezclaran por el efecto de la dispersión. Esto fue posible debido a que el sistema

SIA permitió dividir el análisis en dos pasos: 1) aspirar volúmenes de reactivo de FRAP y muestra, y enviarlos inmediatamente al reactor para que se mezclaran y reaccionarán, 2) aspirar volúmenes del radical ABTS<sup>•+</sup> y muestra, para ser enviados al mismo reactor donde se mantenía el producto de reacción del ensayo FRAP, y enviar los dos bolos de producto de reacción de ambos ensayos hacia el detector. La secuencia usada en esta ocasión fue **antioxidante-FRAP-antioxidante-ABTS** con volúmenes de aspirado de **38-33-38-33 μL**, respectivamente. En esta nueva configuración, al mezclar el reactivo de FRAP, el radical ABTS<sup>•+</sup> y el agua destilada (blanco) a través del sistema SIA propuesto, se observaron dos señales (picos) a 593 nm. El primer pico registró una absorbancia de  $0.027 \pm 0.006$  unidades y el segundo  $0.184 \pm 0.004$  unidades, lo cual indicó que a 593 nm primero se observa un pico del blanco del reactivo FRAP y luego otro pico del blanco del radical ABTS<sup>•+</sup> que, aunque su máxima absorción es a 734 nm, también absorbe a 593 nm. Por otra parte, a 734 nm únicamente se registró un pico con una absorbancia de  $0.285 \pm 0.006$  unidades, indicando solo la señal correspondiente al blanco del radical ABTS<sup>•+</sup>.

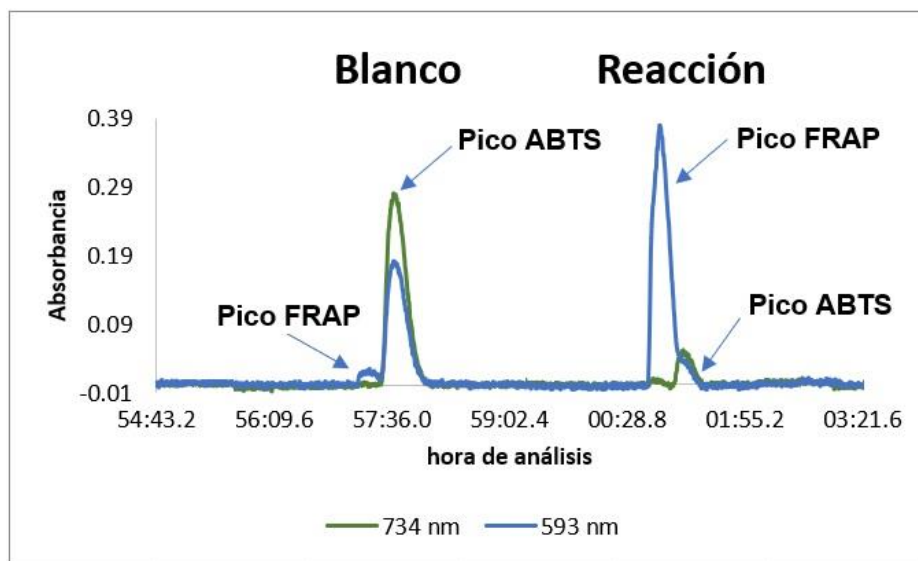
Lo anterior se logró gracias a que el reactor que se agregó a la configuración tuvo varias funciones que ayudaron al método simultáneo. La primera función fue la de separar en dos reservorios a los reactivos y muestra de cada ensayo, de esta manera, mientras el producto de reacción del ensayo FRAP se formaba en el reactor, el reactivo y la muestra del ensayo ABTS se aspiraban en el bucle de espera del colector SIA sin que se mezclaran entre sí ambos ensayos. Otra función fue que ayudó a mejorar el mezclado por difusión radial y axial de los bolos aspirados del ensayo FRAP y ABTS, ya que para llegar al detector los bolos de cada ensayo tuvieron que pasar por el reactor.

Por otro lado, dado que la absorbancia del pico del ABTS<sup>•+</sup> disminuyó en un 35 % al usar una longitud de onda de 593 nm, se optó por usar ambas longitudes de onda en el detector al emplear el método FRAP/ABTS-SIA. De esta manera, a 593 nm solo se consideró el primer pico correspondiente al ensayo de FRAP y a 734 nm el pico correspondiente al ensayo del ABTS.

En adición, al mezclar el reactivo de FRAP, el radical ABTS<sup>•+</sup> y el estándar trolox a través del método FRAP/ABTS-SIA propuesto, se midieron dos picos indicativos de



que la reacción para cada ensayo se llevó a cabo. Por lo tanto, cuando se utilizaron concentraciones de trolox en aumento de 20 a 140  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , el primer pico del ensayo FRAP incrementó y el segundo pico del ensayo ABTS disminuyó con respecto a sus valores de absorbancia (**figura 3.6**).



**Figura 3.6.** FIAgrama de la señal de reacción del sistema SIA, empleando los ensayos ABTS y FRAP de manera simultánea frente a trolox 140  $\mu\text{mol L}^{-1}$

### 3.5.1.3 Evaluación de la secuencia de aspirado

En la **tabla 3.6** se muestran los resultados obtenidos después de evaluar las 8 secuencias de aspirado propuestas usando el estándar de trolox 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Los experimentos del 1 al 4 mostraron los valores más altos de absorbancia para ambos ensayos, sin embargo, se optó por repetir estos experimentos usando trolox a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e introducir un paso más en la secuencia, aspirando 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada al final de la secuencia de aspirado antes de dispensar todo el bolo a la celda de flujo. El incremento de la concentración de trolox fue para notar aún más la diferencia en el grado de reacción de cada ensayo y de ésta elegir la secuencia que brinde mayores valores de  $A_{\text{FRAP}}$  y  $A_{\text{ABTS}}$ .

El aspirado de 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada al final de la secuencia de aspirado ayudó a mejorar la separación de las señales analíticas pertenecientes a los ensayos FRAP y ABTS. Lo anterior se debió a que en estas secuencias el bolo producido por el segundo ensayo (aspirado en cualquiera de las 4 secuencias) se dispersó

con el bolo del primer ensayo aspirado, entonces, aspirar un volumen de agua como último paso permitió que ambos bolos no se mezclaran por dispersión.

Dichos experimentos dieron como resultado la elección de la secuencia **Antioxidante-FRAP-ABTS-Antioxidante** con los valores más altos de  $A_{FRAP}$  y  $A_{ABTS}$  de  $0.271 \pm 0.002$  y  $0.197 \pm 0.003$ , respectivamente. Esto se debió a que al estar ambos reactivos en la parte medía de la secuencia, divididos por el volumen de agua que los separaba por el reactor empleado, se obtuvo una buena dispersión de ambos reactivos con los volúmenes de muestra y el portador, permitiendo una reacción más exhaustiva con valores de  $A_{FRAP}$  y  $A_{ABTS}$  altos.

**Tabla 3.6.** Resultados para la elección de la secuencia de aspirado, en función de la absorbancia estimada para cada ensayo utilizando trolox a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$

| Experimento | Secuencia de aspirado                | $A_{FRAP}$ a 593 nm | $A_{ABTS}$ a 734 nm |
|-------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1           | FRAP–Antioxidante-ABTS-Antioxidante  | $0.154 \pm 0.002$   | $0.126 \pm 0.003$   |
| 2           | Antioxidante-FRAP-Antioxidante-ABTS  | $0.138 \pm 0.010$   | $0.110 \pm 0.003$   |
| 3           | FRAP–Antioxidante-Antioxidante-ABTS  | $0.143 \pm 0.003$   | $0.108 \pm 0.003$   |
| 4           | Antioxidante-FRAP-ABTS-Antioxidante  | $0.140 \pm 0.006$   | $0.114 \pm 0.005$   |
| 5           | ABTS-Antioxidante-FRAP–Antioxidante  | $0.107 \pm 0.001$   | $0.114 \pm 0.005$   |
| 6           | Antioxidante-ABTS-Antioxidante-FRAP  | $0.105 \pm 0.002$   | $0.104 \pm 0.003$   |
| 7           | ABTS-Antioxidante-Antioxidante-FRAP  | $0.090 \pm 0.001$   | $0.113 \pm 0.002$   |
| 8           | Antioxidante-ABTS- FRAP–Antioxidante | $0.124 \pm 0.002$   | $0.116 \pm 0.003$   |

### 3.5.2 Diseño compuesto central (DCC) para la optimización del sistema FRAP/ABTS-SIA

Con la finalidad de encontrar los factores que influyeron significativamente sobre el método simultáneo y a su vez obtener las condiciones óptimas, se realizó el análisis del DCC. Es importante destacar que, aunque el método realiza una determinación en simultáneo de dos ensayos, se obtienen dos señales analíticas independientes, y por tanto, se trabaja con dos variables de respuestas ( $A_{FRAP}$  y  $A_{ABTS}$ ). La matriz del diseño, así como los resultados de cada experimento son mostrados en la **tabla 3.7.**

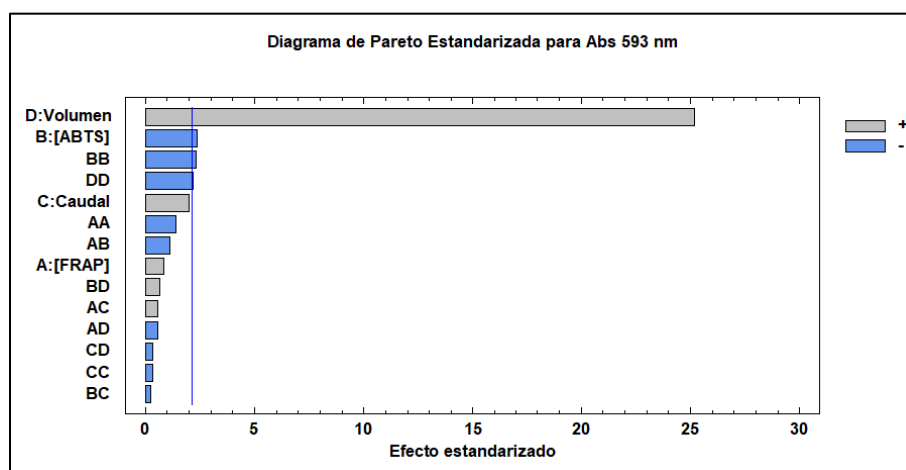
**Tabla 3.7.** DCC en 3 bloques con 3 puntos centrales, para evaluar los factores concentración FRAP, concentración del radical ABTS<sup>•+</sup> volumen de aspirado y caudal del sistema FRAP/ABTS-SIA, usando  $A_{FRAP}$  y  $A_{ABTS}$  como variables de respuesta y Trolox  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  como estándar

| Bloque | Concentración FRAP <sup>a</sup> | Concentración ABTS <sup>•+</sup> <sup>a</sup> | Volúmenes de Aspirado <sup>b</sup> | Caudal <sup>c</sup> | $A_{FRAP}$ 593 nm | $A_{ABTS}$ 734 nm |
|--------|---------------------------------|---|------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 1      | 100                             | 20  | 28/23/23/28                        | 25                  | 0.129             | 0.086             |
| 1      | 100                             | 50  | 38/33/33/38                        | 25                  | 0.166             | 0.109             |
| 1      | 80                              | 20  | 38/33/33/38                        | 25                  | 0.172             | 0.130             |
| 1      | 100                             | 20  | 38/33/33/38                        | 35                  | 0.177             | 0.137             |
| 1      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.155             | 0.107             |
| 1      | 80                              | 20  | 28/23/23/28                        | 35                  | 0.133             | 0.094             |
| 1      | 100                             | 50  | 28/23/23/28                        | 35                  | 0.128             | 0.096             |
| 1      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.151             | 0.109             |
| 1      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.152             | 0.114             |
| 1      | 80                              | 50  | 28/23/23/28                        | 25                  | 0.125             | 0.103             |
| 1      | 80                              | 50  | 38/33/33/38                        | 35                  | 0.175             | 0.162             |
| 2      | 100                             | 50  | 38/33/33/38                        | 35                  | 0.170             | 0.145             |
| 2      | 80                              | 50  | 28/23/23/28                        | 35                  | 0.114             | 0.106             |
| 2      | 100                             | 50  | 28/23/23/28                        | 25                  | 0.117             | 0.103             |
| 2      | 80                              | 50  | 38/33/33/38                        | 25                  | 0.171             | 0.133             |
| 2      | 80                              | 20  | 38/33/33/38                        | 35                  | 0.170             | 0.130             |
| 2      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.150             | 0.112             |
| 2      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.155             | 0.117             |
| 2      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.158             | 0.115             |
| 2      | 100                             | 20  | 28/23/23/28                        | 35                  | 0.128             | 0.093             |
| 2      | 80                              | 20  | 28/23/23/28                        | 25                  | 0.119             | 0.098             |
| 2      | 100                             | 20  | 38/33/33/38                        | 25                  | 0.176             | 0.130             |
| 3      | 90                              | 35  | 23/18/18/23                        | 30                  | 0.103             | 0.111             |
| 3      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.147             | 0.111             |
| 3      | 90                              | 5   | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.148             | 0.000             |
| 3      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.154             | 0.113             |
| 3      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.153             | 0.107             |
| 3      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 40                  | 0.157             | 0.111             |
| 3      | 90                              | 65  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.141             | 0.109             |
| 3      | 90                              | 35  | 33/28/28/33                        | 20                  | 0.145             | 0.122             |
| 3      | 90                              | 35  | 43/38/38/43                        | 30                  | 0.187             | 0.147             |
| 3      | 70                              | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.146             | 0.107             |
| 3      | 110                             | 35  | 33/28/28/33                        | 30                  | 0.149             | 0.110             |

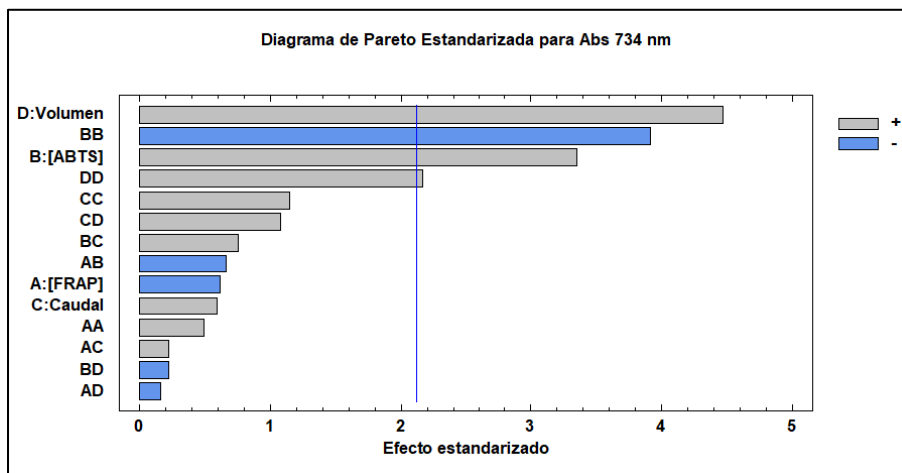
<sup>a</sup> Valores expresados en porcentajes (v/v); <sup>b</sup> volumen expresado en  $\mu\text{L}$  (Antioxidante/FRAP/ABTS/ Antioxidante); <sup>c</sup> caudal expresado en  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para cada factor evaluado indicaron que el volumen de aspirado y la concentración del radical ABTS<sup>•+</sup> influyeron significativamente sobre la experimentación (valor  $P < 0.05$ ), al analizar el diseño tanto para la variable de respuesta  $A_{FRAP}$  como para  $A_{ABTS}$ .

Sin embargo, al analizar los diagramas de Pareto para cada variable de respuesta (**figuras 3.7 y 3.8**), se observó que existían diferencias en cuanto a la influencia ejercida por la concentración de los reactivos propios de cada ensayo. Destacando de esta manera que cuando se analiza el diseño en función de la variable de respuesta del ensayo FRAP ( $A_{FRAP}$ ), el diseño sugiere incrementar la concentración del reactivo FRAP y disminuir la concentración del radical ABTS. Por el contrario, al analizar el diseño en función de la variable de respuesta del ensayo ABTS ( $A_{ABTS}$ ), el diseño sugiere incrementar la concentración del radical ABTS y disminuir la concentración del reactivo FRAP.



**Figura 3.7.** Diagrama de Pareto estandarizado con interacciones binarias de los factores, para maximizar la respuesta del sistema FRAP/ABTS-SIA, empleando  $A_{FRAP}$  como variable de respuesta



**Figura 3.8.** Diagrama de Pareto estandarizado con interacciones binarias de los factores, para maximizar la respuesta del sistema FRAP/ABTS-SIA, empleando  $A_{ABTS}$  como variable de respuesta.

Cada análisis del diseño en función de su variable de respuesta propuso valores óptimos de cada factor evaluado, presentando diferencia en cuanto a los valores óptimos para el reactivo FRAP y radical ABTS. Sin embargo, los valores óptimos sugeridos para el caudal ( $40 \mu\text{L s}^{-1}$ ) y volumen de aspirado (Antioxidante ( $43 \mu\text{L}$ ) – FRAP ( $38 \mu\text{L}$ ) – ABTS ( $38 \mu\text{L}$ ) – Antioxidante ( $43 \mu\text{L}$ )), fueron exactamente los mismos en cada análisis del diseño.

Debido a lo anterior, se realizaron 3 experimentos adicionales mostrados en la **tabla 3.8** para optimizar las concentraciones de cada reactivo, usando trolox a  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ , los valores de caudal y volumen de aspirado previamente optimizados, y como variables de respuesta  $A_{FRAP}$  y  $A_{ABTS}$ .

Los resultados de cada experimento mostraron que las  $A_{FRAP}$  de los experimentos 2 y 3 eran muy similares, sin embargo, el experimento 2 mostraba los valores más altos de  $A_{ABTS}$ . De esta manera, se eligieron valores óptimos de concentraciones del reactivo de FRAP al 70 % y el radical  $ABTS^{*+}$  al 50 %.

**Tabla 3.8.** Experimentos para determinar los valores óptimos de concentración para el reactivo de FRAP y el radical ABTS<sup>•+</sup> usando trolox a 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

| Experimento | Concentración FRAP | Concentración ABTS <sup>•+</sup> | A <sub>FRAP</sub>  | A <sub>ABTS</sub>  |
|-------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|
| 1           | 96 %               | 27 %                             | 0.185±0.009        | 0.167±0.018        |
| 2           | <b>70 %</b>        | <b>50 %</b>                      | <b>0.195±0.006</b> | <b>0.179±0.002</b> |
| 3           | 80 %               | 40 %                             | 0.197±0.007        | 0.160±0.005        |

Cada experimento fue fijado a un caudal de 40  $\mu\text{L s}^{-1}$  y volumen de aspirado (Antioxidante (43  $\mu\text{L}$ )-FRAP(38  $\mu\text{L}$ )-ABTS(38  $\mu\text{L}$ )-Antioxidante (43  $\mu\text{L}$ )).

### 3.5.3 Características del método propuesto

En este apartado se determinaron para cada ensayo los parámetros estadísticos (intervalo lineal y límites de detección y cuantificación) y de validación (precisión, recuperaciones y correlación con método de referencia) del método simultáneo, debido el método presentó señales separadas para cada ensayo.

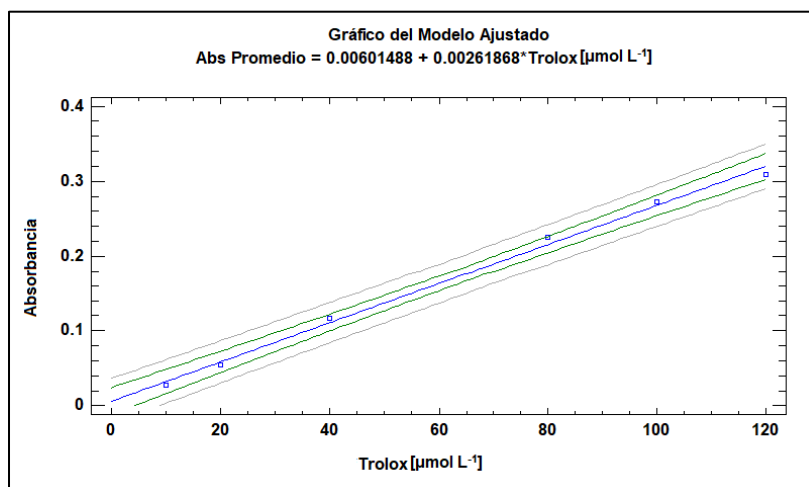
#### 3.5.3.1 Curva de calibración

Para el método propuesto, se graficaron las absorbancias obtenidas de cada ensayo al utilizar concentraciones de trolox en un intervalo de 5 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sin embargo, para el ensayo FRAP la linealidad fue de 5 a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox, y para el ensayo ABTS de 5 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox. Por lo tanto, se estableció un intervalo de concentraciones de 10 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox, para ambos ensayos, dado que el análisis es realizado de manera simultánea y el intervalo lineal debe ser el mismo para ambos ensayos. Lo anterior se justifica en que el método simultáneo debe poder realizar ambas curvas de calibración al mismo tiempo en el mismo intervalo lineal, y a su vez la muestra que se analice sea tratada (diluida) en función de este intervalo para los dos ensayos.

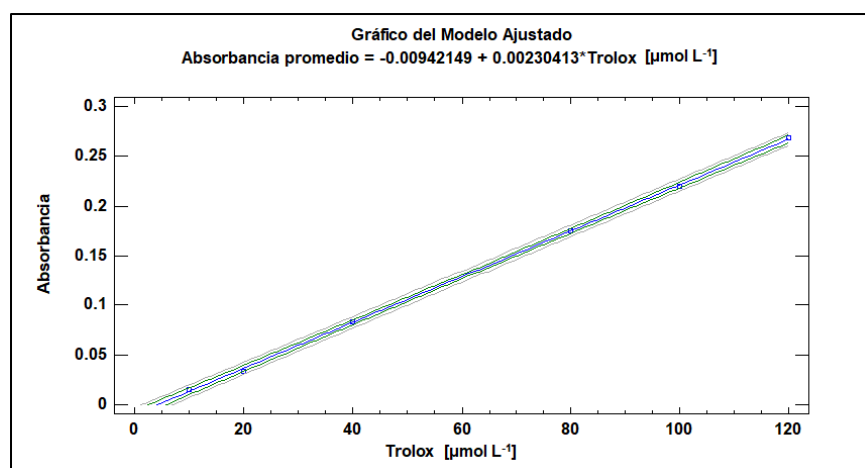
Con la finalidad de obtener un mejor estimado de las curvas de calibración (10 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox) de cada ensayo, se decidió construir una curva diariamente durante 5 días. Con los datos de las 5 curvas de calibración, se propuso construir una curva promedio para las determinaciones de capacidad antioxidante llevadas a cabo por cada ensayo por el sistema SIA simultáneo, dichas curvas de calibración son mostradas en las **figuras 3.9 y 3.10**. La ecuación de regresión lineal de la curva para el ensayo FRAP tuvo una pendiente de  $0.0026 \pm 0.0001$ , una intersección de  $0.0060 \pm 0.0065$ , un coeficiente de correlación de 0.9979, límites de detección y

cuantificación de  $0.0313$  y  $0.0912 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, con un intervalo de confianza al 95 %.

Por otro lado, la curva del ensayo ABTS tuvo una pendiente de  $0.00230 \pm 0.00002$ , una intersección de  $-0.0094 \pm 0.0014$ , un coeficiente de correlación de  $0.9999$ , límites de detección y cuantificación de  $0.0047$  y  $0.0062 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, con el mismo intervalo de confianza. Ambas curvas presentaron una pendiente positiva, destacando una mayor sensibilidad a las variaciones de concentración de trolox la curva del ensayo FRAP.



**Figura 3.9.** Curva promedio para determinación de capacidad antioxidante para el ensayo FRAP usando en sistema FRAP/ABTS-SIA



**Figura 3.10.** Curva promedio para determinación de capacidad antioxidante para el ensayo ABTS usando en sistema FRAP/ABTS-SIA

### 3.5.3.2 Precisión intermedia

En este apartado la precisión del método FRAP/ABTS-SIA fue evaluada, y se utilizó un estándar de trolox y una muestra para este estudio con la finalidad de observar

que tan preciso es el método simultáneo al usar un compuesto puro y una matriz compleja que involucra a más de un compuesto.

Los valores de capacidad antioxidante de trolox  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  y extracto de café honey al 0.5 % para determinar la precisión son mostrados en las **tablas A3.1 y A3.2 de los anexos**, y expresados en unidades de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox.

La repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio para el ensayo FRAP fueron de 1.70 y 2.04 % para el extracto de café honey, así como 1.14 y 1.89 % para el estándar trolox, respectivamente. Por otro lado, el ensayo ABTS mostró 0.78 y 1.82 % para el extracto de café honey, así como 0.87 y 2.09 % para el estándar trolox, respectivamente. Dichos valores mostraron en ambos casos ser inferiores o iguales a 2 %, lo cual denota que el sistema FRAP/ABTS-SIA para los ensayos ABTS y FRAP presenta una buena precisión acorde con los criterios de la AOAC y el CODEX Alimentarius <sup>103,105</sup>. En adición, para ambos ensayos la precisión realmente no presenta diferencias sustanciales entre usar un compuesto puro o una matriz compleja.

### 3.5.3.3 Recuperaciones

Los porcentajes de recobro obtenidos para ambos ensayos utilizando el sistema SIA simultáneo son presentados en la **tabla 3.9**, y es posible observar que se encuentran en un intervalo de 97.34 a 106.19 % y de 92.75 a 105.43 % para el ensayo FRAP y ABTS, respectivamente, lo cual indica que el sistema FRAP/ABTS-SIA para determinar capacidad antioxidante presenta una buena exactitud sin presentar interferencias por efecto de la matriz analizada.

**Tabla 3.9.** Porcentajes de recobro obtenidos para el ensayo FRAP por el sistema FRAP/ABTS-SIA

| Muestras                         | %R<br>FRAP | %R<br>ABTS |
|----------------------------------|------------|------------|
| Extracto de café honey (0.57 %)  | 101.13     | 101.09     |
| Extracto de café lavado (0.57 %) | 102.08     | 97.83      |
| Extracto de té verde (0.20 %)    | 97.66      | 103.26     |
| Jugo de arándano (2.50 %)        | 102.40     | 105.43     |
| Jugo de granada (0.45 %)         | 104.30     | 98.91      |
| Vino Carmenere (0.25 %)          | 106.19     | 102.90     |
| Vino Merlot (0.25 %)             | 104.30     | 103.26     |
| Extracto de orégano (0.63 %)     | 100.19     | 99.28      |
| Extracto de comino (4.00 %)      | 97.34      | 92.75      |
| Extracto de romero (1.25 %)      | 98.92      | 96.01      |

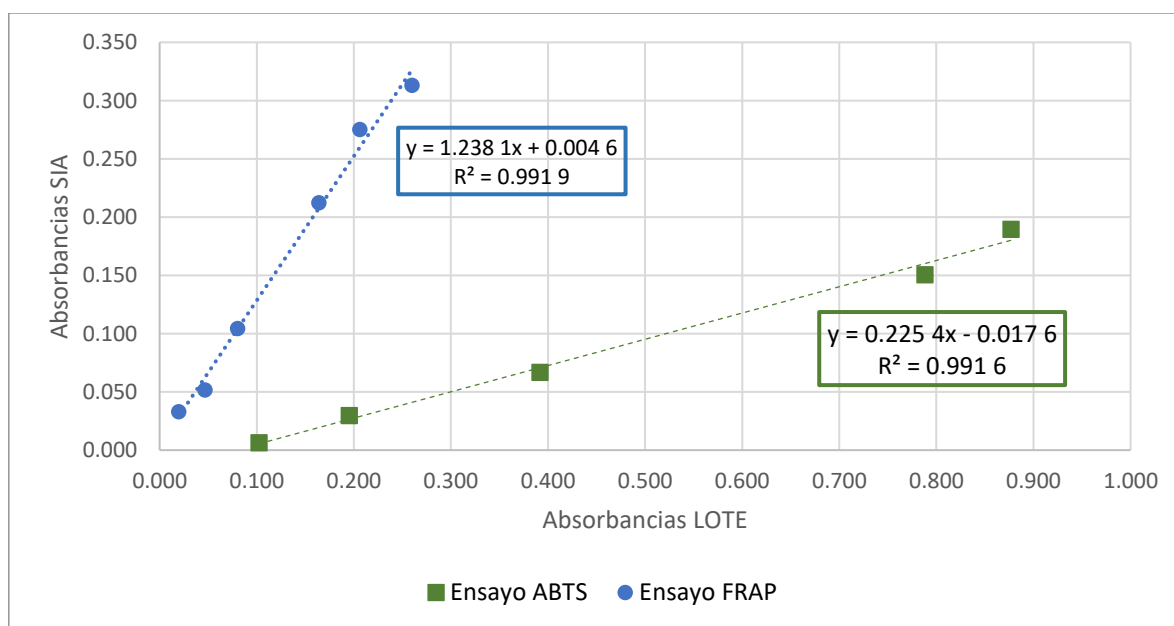
%R: porcentaje de recuperación.



### 3.5.3.4 Correlación entre los métodos FRAP/ABTS-SIA y microplaca

La implementación de los ensayos FRAP y ABTS por microplaca permitió la construcción de sus respectivas curvas de calibración usando estándares de trolox, para posteriormente cuantificar la capacidad antioxidante de diversas muestras alimenticias. El ensayo FRAP por microplaca tuvo una curva de calibración con un intervalo lineal de 5 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , una pendiente de  $0.00210 \pm 0.00004$  y una ordenada al origen de  $-0.0032 \pm 0.0027$ . El ensayo ABTS por microplaca tuvo una curva de calibración con un intervalo lineal de 5 a 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , una pendiente de  $0.0096 \pm 0.0001$  y una ordenada al origen de  $0.0087 \pm 0.0061$ .

Los valores de absorbancia de ambos ensayos SIA simultáneo y por microplaca usando estándares de trolox fueron graficados, para obtener un gráfico de correlación entre ambos métodos (**figura 3.11**). En consecuencia, se obtuvo una correlación del 99 % para ambos ensayos, confirmando la existencia de una correlación directa de las respuestas analíticas por ambos métodos, asegurando la confiabilidad de los valores de capacidad antioxidante por el sistema FRAP/ABTS-SIA. El ensayo FRAP mostró una pendiente 5 veces mayor a la del ensayo ABTS, esto debido a que el ensayo FRAP empleó el reactivo FRAP a una concentración menor a lo usualmente empleado en la literatura, a diferencia del ensayo ABTS en donde se tuvo que incrementar la concentración del radical y en consecuencia disminuyó la sensibilidad de dicho ensayo.



**Figura 3.11.** Correlación de absorbancias de los ensayos FRAP y ABTS, por el sistema FRAP/ABTS-SIA vs microplaca al emplear concentraciones de Trolox de 10 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para el ensayo FRAP y de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para el ensayo ABTS

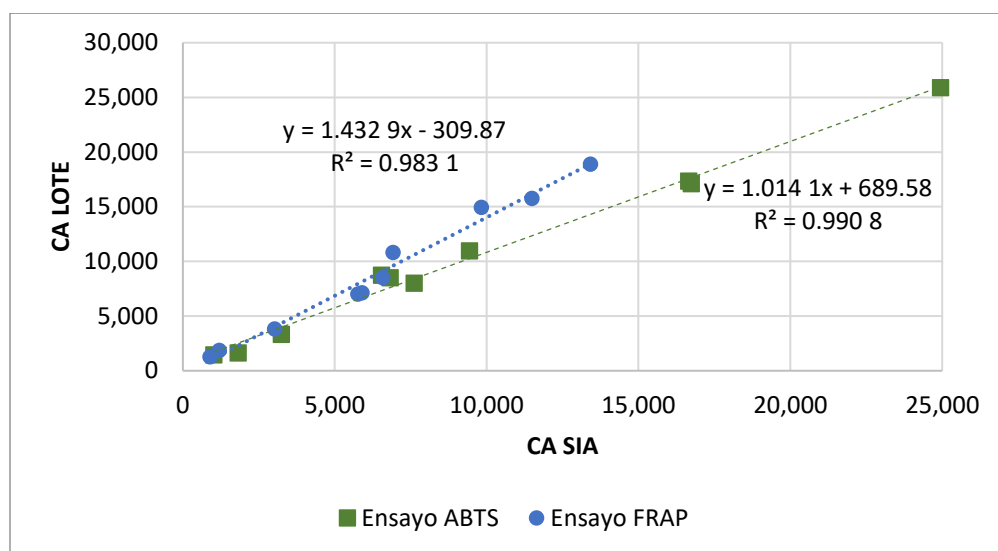
### 3.5.3.5 Aplicación del método FRAP/ABTS-SIA

Para este estudio se analizaron 10 muestras alimenticias por el sistema FRAP/ABTS-SIA y los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos por los métodos en microplaca para los ensayos FRAP y ABTS por separado. La **tabla 3.10** muestra los resultados de capacidad antioxidante expresados en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox, para los ensayos FRAP y ABTS, tanto por FRAP/ABTS-SIA y microplaca. Después de realizar el estadístico de muestras pareadas, se obtuvo que los resultados por SIA simultáneo y por microplaca mostraron una diferencia significativa en los valores. Por otro lado, al graficar las capacidades antioxidantes de las muestras por ambos métodos (**figura 3.12**), se correlacionaron los resultados en un 98 % para el ensayo FRAP y del 99 % para el ensayo ABTS, indicando que, aunque no se tienen valores iguales de capacidad antioxidante para las muestras, las tendencias son las mismas y se correlacionan por ambos métodos.

**Tabla 3.10.** Resultados de capacidad antioxidante en diferentes muestras alimenticias por el método FRAP/ABTS-SIA y el método por microplaca

| Muestras                | ABTS             |                   | FRAP             |                   |
|-------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                         | SIA <sup>a</sup> | LOTE <sup>a</sup> | SIA <sup>a</sup> | LOTE <sup>a</sup> |
| Extracto de café honey  | 6 830.07±430.41  | 8 507.20±321.38   | 6 591.95±536.46  | 8 523.48±1 137.97 |
| Extracto de café lavado | 7 616.30±343.10  | 8 022.79±63.79    | 5 906.13±299.28  | 7 145.51±170.96   |
| Extracto de té verde    | 24 949.28±307.44 | 25 897.93±403.14  | 13 429.75±670.43 | 18 919.64±406.42  |
| Jugo de arándano        | 1 822.03±155.88  | 1 652.47±105.15   | 1 203.33±26.28   | 1 866.33±47.24    |
| Jugo de granada         | 9 447.25±438.33  | 10 984.03±212.19  | 6 924.23±315.88  | 10 819.17±412.98  |
| Vino tinto Carmenere    | 16 655.07±491.90 | 17 341.30±291.63  | 11 502.31±613.10 | 15 765.65±573.48  |
| Vino tinto Merlot       | 16 742.03±482.70 | 17 133.69±157.20  | 9 833.59±546.97  | 14 946.73±525.30  |
| Extracto de orégano     | 6 546.09±263.37  | 8 752.37±489.97   | 5 763.97±70.07   | 7 036.98±198.66   |
| Extracto de comino      | 1 022.83±34.94   | 1 477.42±31.57    | 894.30±68.37     | 1 280.63±6.77     |
| Extracto de romero      | 3 244.06±243.48  | 3 340.93±95.77    | 3 028.63±139.04  | 3 846.05±108.38   |

<sup>a</sup> Valores de capacidad antioxidante expresados en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de trolox.



**Figura 3.12.** Correlación de capacidad antioxidante (CA) de los ensayos FRAP y ABTS, por FRAP/ABTS-SIA y microplaca para 10 muestras alimenticias.

### 3.6 CONCLUSIONES

- El método propuesto es el primer método reportado para determinar la capacidad antioxidante empleando los ensayos ABTS y FRAP de manera simultánea a través de un sistema SIA. El método ofrece una tasa de muestreo de hasta 30 muestras por hora, presenta una configuración sencilla y no requiere un tiempo prolongado de reacción.
- Se redujeron los volúmenes de muestra y reactivo involucrados en cada ensayo, así como las concentraciones de los reactivos. El tiempo de análisis del método fue de 2 minutos, lo cual, indica un análisis rápido si consideramos que por cada análisis se obtienen dos valores de capacidad antioxidante de dos ensayos distintos.
- La principal ventaja del método propuesto radica en la posibilidad de realizar la medición de capacidad antioxidante con dos señales independientes propias de cada ensayo con un solo análisis, a pesar de que cada ensayo presenta diferentes cinéticas de reacción.
- El sistema SIA se caracterizó por presentar una buena precisión con un porcentaje menor o igual al 2 %, barrera que en los métodos por lote es difícil superar, debido a los errores de manipulación y dispensado de muestras y reactivos.

## CONCLUSIONES GENERALES

Todos los métodos SIA desarrollados, optimizados y validados en este trabajo demostraron el alto potencial que presentan las técnicas de análisis por flujo para la determinación de capacidad antioxidante por diversos ensayos. Los 3 métodos SIA propuestos fueron totalmente nuevos, lo cual los convierte en los primeros y únicos en su tipo para la determinación de capacidad antioxidante. Aunque los métodos fueron evaluados en muestras alimenticias, la finalidad es poder aplicarlos a distintas muestras y que cada método demuestre que tan robusto puede llegar a ser.

Los métodos SIA demostraron tener ventajas frente a los métodos de referencia (ensayos por microplacas), entre las cuales podemos destacar la reducción en el consumo de muestra y reactivos, el acortamiento de los tiempos de análisis y la minimización en los errores por manipulación del analista. A pesar de que la tasa de muestreo de los métodos por microplaca es alta (96 muestras por placa), el uso de los 96 pozos dependerá de las necesidades de cada analista, ya que se requerirá el mismo tiempo de análisis para una muestra o para 96. De esta manera, los métodos SIA ofrecen un tiempo de análisis más rápido por muestra que los métodos por microplaca, siendo estos métodos SIA una alternativa para cuantificar capacidad antioxidante con una alta precisión a diferencia de los métodos por microplaca. En la **Tabla 4.1**, se resumen las principales ventajas y desventajas encontradas para cada uno de los métodos SIA desarrollados.

**Tabla 4.1.** Principales ventajas y desventajas para los métodos SIA desarrollados

| Nombre del método                    | Ventajas  | Desventajas   |
|--------------------------------------|---|---|
| ORAC-SIA                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor concentración de reactivos.</li> <li>• Reducción del tiempo de análisis.</li> <li>• Excelente precisión.</li> <li>• Configuración sencilla.</li> <li>• Valores de CA iguales al método ORAC-microplaca.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor tasa de muestreo en comparación con el método ORAC-Microplaca.</li> <li>• Temperatura de 50 °C no óptima para sistemas biológicos.</li> <li>• Se requiere el uso de una celda de extracción para eliminar burbujas.</li> </ul> |
| FRAP-SIA                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta estabilidad del reactivo FRAP.</li> <li>• Reducción de tiempo de análisis.</li> <li>• Menor consumo de muestra y reactivo.</li> <li>• Excelente precisión.</li> <li>• Configuración sencilla.</li> <li>• Valores de CA similares al método FRAP-microplaca.</li> <li>• No requiere temperatura controlada.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor tasa de muestreo en comparación con el método FRAP-Microplaca.</li> <li>• Muestra preparada sólo en medio acuso.</li> </ul>  |
| FRAP/ABTS-SIA<br>(método simultaneo) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de tiempo de análisis.</li> <li>• Excelente precisión.</li> <li>• Análisis de una misma muestra en simultaneo.</li> <li>• Menor consumo de muestra y reactivo.</li> <li>• No requiere temperatura controlada.</li> <li>• Configuración sencilla.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor tasa de muestreo en comparación con el método FRAP-Microplaca.</li> <li>• Valores de CA distintos a los métodos FRAP y ABTS por microplaca.</li> </ul>   |

CA: Capacidad antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Zanchettin AM, Facciotti F. A collaborative robotic solution to partly automate SARS-CoV-2 serological tests in small facilities. *SLAS Technol.* 2022;27(1):100-106. doi:10.1016/j.slast.2021.10.012
2. Cortez F de J, Gebhart D, Tandel D, et al. Automation of a multiplex agglutination-PCR (ADAP) type 1 diabetes (T1D) assay for the rapid analysis of islet autoantibodies. *SLAS Technol.* 2022;27(1):26-31. doi:10.1016/j.slast.2021.10.001
3. Tentarelli S, Romero R, Lamb ML. Script-based automation of analytical instrument software tasks. *SLAS Technol.* 2022;27(3):209-213. doi:10.1016/j.slast.2021.10.019
4. Ruzicka J (Jarda). Redesigning flow injection after 40 years of development: Flow programming. *Talanta.* 2018;176:437-443. doi:10.1016/j.talanta.2017.08.061
5. Trojanowicz M. Flow-injection analysis as a tool for determination of pharmaceutical residues in aqueous environment. In: *Talanta.* Vol 96. Elsevier B.V.; 2012:3-10. doi:10.1016/j.talanta.2011.12.081
6. Jaccoulet E, Schweitzer-Chaput A, Toussaint B, Prognon P, Caudron E. Simple and ultra-fast recognition and quantitation of compounded monoclonal antibodies: Application to flow injection analysis combined to UV spectroscopy and matching method. *Talanta.* 2018;187:279-286. doi:10.1016/j.talanta.2018.05.042
7. Mesquita RBR, Rangel AOSS. A review on sequential injection methods for water analysis. *Anal Chim Acta.* 2009;648(1):7-22. doi:10.1016/j.aca.2009.06.030
8. Ruzicka J, Hansen EH. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal Chim Acta.* 1975;78:145-157.
9. Cerdà V, Ferrer L, Avivar J, Cerdà A. Evolution and Description of the Principal Flow Techniques. In: *Flow Analysis.* Elsevier; 2014:1-42. doi:10.1016/b978-0-444-59596-6.00001-2
10. Rocha FRP, Nóbrega JA, Fatibello Filho O. Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview. *Green Chemistry.* 2001;3(5):216-220. doi:10.1039/b103187m
11. Melchert WR, Reis BF, Rocha FRP. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Anal Chim Acta.* 2012;714:8-19. doi:10.1016/j.aca.2011.11.044
12. Reis BF, Morales-Rubio A, De La Guardia M. Environmentally friendly analytical chemistry through automation: comparative study of strategies for carbaryl determination with p-aminophenol. *Anal Chim Acta.* Published online 1999:265-272.
13. Francis PS, Lewis SW, Lim KF, Carlsson K, Karlberg B. Flow analysis based on a pulsed flow of solution: theory, instrumentation and applications. *Talanta.* Published online 2002:1029-1042. www.elsevier.com/locate/talanta
14. Cañizares-Macías M del P. Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Revista de la Sociedad Química de México.* 2002;46(2):167-174.
15. Martínez J. *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals.* Firts. Taylor & Francis; 1996.
16. Ruzicka J, Marshall GD. *Sequential Injection : A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays.* Vol 237.; 1990.
17. Erustes JA, Andrade-Eiroa A, Cladera A, Forteza R, Cerdà V. Fast sequential injection determination of benzo[A]pyrene using variable angle fluorescence with on-line solid-phase extraction. *Analyst.* 2001;126(4):451-456. doi:10.1039/b010129j
18. Andrade-Eiroa A, Erustes JA, Forteza R, Cerdà V, Lima JLFC. *Determination of Chloride by Multisyringe Flow Injection Analysis and Sequential Injection Analysis with Potentiometric Detection.* Vol 467.; 2002.
19. Thomas O, Théraulaz F, Cerdà V, Constant D, Quevauviller P. Wastewater quality monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 1997;16(7):419-424.
20. Pinto PCAG, Saraiva MLMFS, Lima JLFC. A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system. *Anal Chim Acta.* 2006;555(2):377-383. doi:10.1016/j.aca.2005.09.009
21. Cerdà V, Estela JM, Forteza R, et al. *Flow Techniques in Water Analysis.* Vol 50.; 1999. www.elsevier.com/locate/talanta
22. Miró M, Cerdà V, Manuel Estela J. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2002;21(3):199-210.

23. Cerdà V, Ferrer L, Portugal LA, de Souza CT, Ferreira SLC. Multisyringe flow injection analysis in spectroanalytical techniques – A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2018;98:1-18. doi:10.1016/j.trac.2017.10.016
24. Almeida MIGS, Estela JM, Cerdà V. Multisyringe flow injection potentialities for hyphenation with different types of separation techniques. *Anal Lett*. 2011;44(1-3):360-373. doi:10.1080/00032719.2010.500779
25. Renata Micha AZ. *Antioxidants in Health and Disease*. Firts. Taylor Francis Group; 2015.
26. Banerjee R, Verma AK, Siddiqui MW. *Natural Antioxidants. Applications in Foods of Animal Origin*. Firts. Taylor & Francis Group; 2017.
27. Halliwell B, C Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fifth. Oxford University Press; 2015.
28. Halliwell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(10):1341-1348.
29. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(5):1147-1150. <http://www.oup.com>
30. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem*. 2016;64(5):997-1027. doi:10.1021/acs.jafc.5b04739
31. Trevisan M, Browne R, Ram M, et al. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. *Am J Epidemiol*. 2001;154(4). <https://academic.oup.com/aje/article/154/4/348/62001>
32. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1502(1):139-144. [www.elsevier.com/locate/bba](http://www.elsevier.com/locate/bba)
33. Guidi I, Galimberti D, Lonati S, et al. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27(2):262-269. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.001
34. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2000;13(3):135-160. doi:10.1021/tx9902082
35. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013;763:1-10. doi:10.1016/j.aca.2012.11.051
36. Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(4):503-515. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016
37. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
38. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 2012;01(01). doi:10.4172/2161-1009.1000106
39. Apak R, Capanoglu E, Shahidi F. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity. Recent Trends and Applications*. Firts. John Wiley & Sons Ltd ; 2018.
40. Huang D, Boxin Ou, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
41. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 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. *J Agric Food Chem*. 2002;50(16):4437-4444. doi:10.1021/jf0201529
42. Mellado-Ortega E, Zabalgogezcoa I, Vázquez de Aldana BR, Arellano JB. Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay. *Anal Biochem*. 2017;519:27-29. doi:10.1016/j.ab.2016.12.009
43. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J Agric Food Chem*. 2001;49(2):4619-4626. doi:10.1051/jp2:1995126
44. Ihsanpuro SI, Gunawan S, Ibrahim R, Aparamarta HW. Extract with high 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) inhibitory capability from pericarp and seed of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) using microwave-assisted extraction (MAE) two-phase solvent technique. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(12). doi:10.1016/j.arabjc.2022.104310
45. Taha M, Imran S, Rahim F, et al. Discovering biological efficacy of new thiadiazole as effective inhibitors of urease, glycation, and (DPPH) scavengers: Biochemical and in silico study. *J Mol Struct*. 2023;1274:49. doi:10.1016/j.molstruc.2022.134

46. Sawczuk R, Karpinska J, Filipowska D, Bajguz A, Hryniewicka M. Evaluation of total phenols content, anti-DPPH activity and the content of selected antioxidants in the honeybee drone brood homogenate. *Food Chem.* 2022;368. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130745
47. Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules.* 2014;19(11):19180-19208. doi:10.3390/molecules191119180
48. Benzie IFF, Strain JJ. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay.* Vol 239.; 1996.
49. Miller' NJ, Rice-Evans C, Davies2 M 1, Gopinathan' V, Milner' A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993;84:407.
50. Indracanti M, Chv S, Sisay T. A 96 well-microtiter plate ABTS based assay for estimation of antioxidant activity in green leafy vegetables. *Biotechnology International.* 2019;12(2):22-29. www.bti.org.in
51. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* Published online 1999.
52. Echegaray N, Pateiro M, Muneke PES, et al. Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: Methods and applications. *Molecules.* 2021;26(13). doi:10.3390/molecules26133880
53. Ukeda H, Adachi Y, Sawamura M. Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance. *Talanta.* 2002;58:1279-1283. www.elsevier.com/locate/talanta
54. Polášek M, Skála P, Opletal L, Jahodář L. Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 2004;379(5-6):754-758. doi:10.1007/s00216-004-2559-4
55. Pellegrini N, Del Rio D, Colombi B, Bianchi M, Brighenti F. Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J Agric Food Chem.* 2003;51(1):260-264. doi:10.1021/jf020657z
56. Lima MJR, Tóth I V., Rangel AOSS. A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. In: *Talanta.* Vol 68. Elsevier; 2005:207-213. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.058
57. Martins AC, Bukman L, Vargas AMM, et al. The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chem.* 2013;138(1):574-580. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.143
58. Ramos II, Gregório BJR, Barreiros L, et al. Programmable flow system for automation of oxygen radical absorbance capacity assay using pyrogallol red for estimation of antioxidant reactivity. *Talanta.* 2016;150:599-606. doi:10.1016/j.talanta.2015.12.061
59. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266:37-56.
60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
61. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
62. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 1999;47(2):633-636. doi:10.1021/jf9807768
63. Miller' NJ, Rice-Evans C, Davies2 M 1, Gopinathan' V, Milner' A. *A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates.* Vol 84.; 1993.
64. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231-1237.
65. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology.* 1995;28:25-30.
66. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity



- on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015;95(1):204-209. doi:10.1002/jsfa.6706
67. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 2012;01(01):1-10. doi:10.4172/2161-1009.1000106
  68. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1993;14:303-311.
  69. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013;763:1-10. doi:10.1016/j.aca.2012.11.051
  70. Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods*. 2015;18:797-810. doi:10.1016/j.jff.2014.12.018
  71. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
  72. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 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. *J Agric Food Chem*. 2002;50(16):4437-4444. doi:10.1021/jf0201529
  73. Mellado-Ortega E, Zabalgoeazcoa I, Vázquez de Aldana BR, Arellano JB. Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay. *Anal Biochem*. 2017;519:27-29. doi:10.1016/j.ab.2016.12.009
  74. Atala E, Aspée A, Speisky H, Lissi E, López-Alarcón C. Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013;32(2):116-125. doi:10.1016/j.jfca.2013.09.007
  75. Ansarihadipour H, Dorostkar H. Comparison of plasma oxidative biomarkers and conformational modifications of hemoglobin in patients with diabetes on hemodialysis. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(11). doi:10.5812/ircmj.22045
  76. Wachtel-Galor S, Wong KW, Benzie IFF. The effect of cooking on Brassica vegetables. *Food Chem*. 2008;110(3):706-710. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.056
  77. Bartosz G. Total Antioxidant Capacity. *Adv Clin Chem*. 2003;37:219-292.
  78. Benzie IFF, Choi SW. Antioxidants in food: Content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol 71. Academic Press Inc.; 2014:1-53. doi:10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8
  79. Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*. 2006;39(7):791-800. doi:10.1016/j.foodres.2006.02.003
  80. Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2005;1721(1-3):174-184. doi:10.1016/j.bbagen.2004.11.001
  81. Bolanos De La Torre AAS, Henderson T, Nigam PS, Owusu-Apenten RK. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem*. 2015;174:119-123. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.009
  82. Tsao R, Yang R, Young JC. Antioxidant Isoflavones in Osage Orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *J Agric Food Chem*. 2003;51(22):6445-6451. doi:10.1021/jf0342369
  83. Jimenez-Alvarez D, Giuffrida F, Vanrobaeys F, et al. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro. *J Agric Food Chem*. 2008;56(10):3470-3477. doi:10.1021/jf03723s
  84. Smith AD, Morris VC, Levander OA. *Rapid Determination of Glutathione Peroxidase and Thioredoxin Reductase Activities Using a 96-Well Microplate Format: Comparison to Standard Cuvette-Based Assays*. Vol 71.; 2001.
  85. Lampinen J, Raitio M, Perälä A, Oranen H, Harinen RR. *Microplate Based Pathlength Correction Method for Photometric DNA Quantification Assay*.; 2012.
  86. Rojas-López A, Cañizares-Macías MP. Antioxidant Capacity in Vanilla Extracts Obtained by Applying Focused Microwaves. *Food Nutr Sci*. 2013;04(08):244-253. doi:10.4236/fns.2013.48a030
  87. Ruzicka J, Marshall GD. *Sequential Injection : A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays*. Vol 237.; 1990.

88. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth. (Miller JN, Miller JC, eds.). Pearson; 2010. [www.pearsoned.co.uk/Miller](http://www.pearsoned.co.uk/Miller)
89. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(6-7):669-675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
90. N Miller J, C Miller J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth edit. Pearson Education Limited; 2010. [www.pearsoned.co.uk](http://www.pearsoned.co.uk)
91. Bolanos De La Torre AAS, Henderson T, Nigam PS, Owusu-Apenten RK. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem*. 2015;174:119-123. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.009
92. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth. Pearson; 2010. [www.pearsoned.co.uk/Miller](http://www.pearsoned.co.uk/Miller)
93. Eurolab España, Morillas Bravo PP, Magnusson B, Örnemark U. *Guía Eurachem: La Adecuación al Uso de Los Métodos Analíticos – Una Guía de Laboratorio Para La Validación de Métodos y Temas Relacionados*. Vol 1 ed.; 2016. Accessed May 14, 2022. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
94. FDA. *Guidelines for Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products*.; 2019. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
95. Meanha P, Kongkedsuk J, Hongwitayakorn A, Chaisuksant R. *Antioxidant Capacity Assays by Sequential Injection Analysis Using a Peristaltic Pump and Low-Cost Amperometric Detection with Pencil Lead Electrodes*. Vol 49.; 2015.
96. Ribeiro JPN, Magalhães LM, Reis S, Lima JLFC, Segundo MA. High-throughput Total Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity of Biological Samples Determined Using Flow Injection Analysis and Microplate-based Methods. *Analytical Sciences*. 2011;27.
97. Herald TJ, Gadgil P, Tilley M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J Sci Food Agric*. 2012;92(11):2326-2331. doi:10.1002/jsfa.5633
98. Ribeiro JPN, Magalhães LM, Reis S, Lima JLFC, Segundo MA. High-throughput Total Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity of Biological Samples Determined Using Flow Injection Analysis and Microplate-based Methods. *Analytical Sciences*. 2011;27(5):483-488. doi:10.2116/analsci.27.483
99. Jimenez D, Giuffrida F, Vanrobaeys F, et al. High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro. *J Agric Food Chem*. 2008;56(10):3470-3477. doi:10.1021/jf703723s
100. Ramos II, Gregório BJR, Barreiros L, et al. Programmable flow system for automation of oxygen radical absorbance capacity assay using pyrogallol red for estimation of antioxidant reactivity. *Talanta*. 2016;150:599-606. doi:10.1016/j.talanta.2015.12.061
101. Polášek M, Skála P, Opletal L, Jahodář L. Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal Bioanal Chem*. 2004;379(5-6):754-758. doi:10.1007/s00216-004-2559-4
102. Meanha P, Kongkedsuk J, Hongwitayakorn A, Chaisuksant R. Antioxidant capacity assays by sequential injection analysis using a peristaltic pump and low-cost amperometric detection with pencil lead electrodes. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 2015;49(6):895-904.
103. AOAC International. *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*.; 2019.
104. Ustundag Y, Huysal K, Kahvecioglu S, et al. Establishing reference values and evaluation of an in-house ferric reducing antioxidant power (FRAP) colorimetric assay in microplates. *The European Research Journal*. 2016;0(0). doi:10.18621/eurj.2016.5000190265
105. FAO/WHO. *Codex Alimentarius Commission : Procedural Manual*. 21st ed.; 2013.
106. Tormin TF, Cunha RR, Richter EM, Munoz RAA. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. *Talanta*. 2012;99:527-531. doi:10.1016/j.talanta.2012.06.024
107. Freitas JM, Oliveira TDC, Gimenes DT, Munoz RAA, Richter EM. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *Talanta*. 2016;146:670-675. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.048

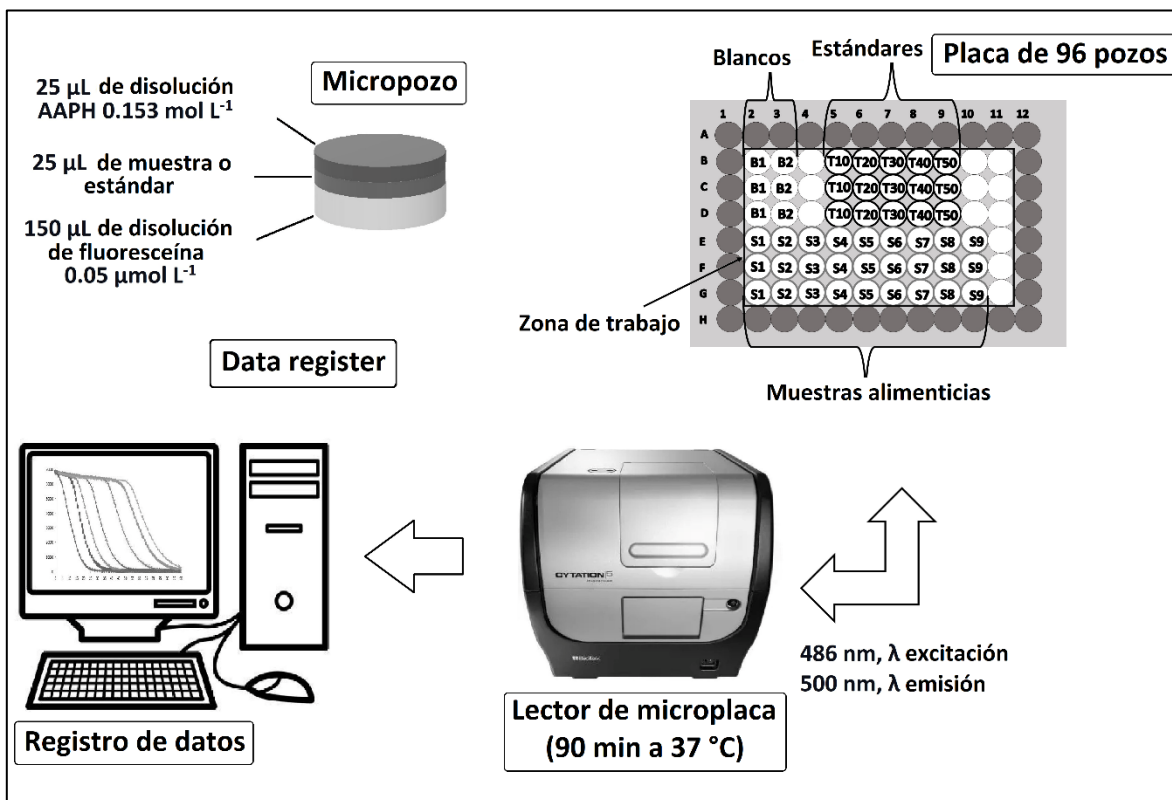
108. Gonzalez ´ M, Gallego M, Valcarceí analytical M. *Gas Chromatographic Flow Method for the Preconcentration and Simultaneous Determination of Antioxidant and Preservative Additives in Fatty Foods*. Vol 848.; 1999.
109. Salazar-Beltrán D, Hinojosa-Reyes L, Ruiz-Ruiz E, Hernández-Ramírez A, Luis Guzmán-Mar J. Determination of phthalates in bottled water by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography with uv detection. *Talanta*. 2017;168:291-297. doi:10.1016/j.talanta.2017.03.060
110. Saurina J. Flow-injection analysis for multi-component determinations of drugs based on chemometric approaches. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29(9):1027-1037. doi:10.1016/j.trac.2010.05.012
111. Nacapricha D, Sastranurak P, Mantim T, et al. Cross injection analysis: Concept and operation for simultaneous injection of sample and reagents in flow analysis. *Talanta*. 2013;110:89-95. doi:10.1016/j.talanta.2013.02.012
112. Lrif Anderson. *Simultaneous Spectrophotometric Determination of Nitrite and Nitrate by Flow Injection Analysis*. Vol 110.; 1979.
113. Luque De Castro MD, Cases MV. *Simultaneous Determinations in Flow Injection Analysis A Review*. Vol 109.; 1984.
114. Kubáň V. Simultaneous Determination of Several Components by Flow Injection Analysis. *Crit Rev Anal Chem*. 1992;23(1-2):15-53. doi:10.1080/10408349208051646
115. Trojanowicz M. *Advances in Flow Analysis*. Vol I. First. (Trojanowicz M, ed.). WILEY-VCH; 2008.
116. Mas-Torres F, Munõz A, Estela JM, Cerdà V. *Simultaneous Determination of Phosphate and Silicate in Waste Water by Sequential Injection Analysis*.; 1997.
117. Kozak J, Paluch J, Węgrzecka A, et al. Single peak parameters technique for simultaneous measurements: Spectrophotometric sequential injection determination of Fe(II) and Fe(III). *Talanta*. 2016;148:626-632. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.040
118. Vishnikin A, Miekh Y, Denisenko T, Bazal Y, Andruch V. Use of sequential injection analysis with lab-at-valve and an optical probe for simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid and cysteine by mean centering of ratio kinetic profiles. *Talanta*. 2018;188:99-106. doi:10.1016/j.talanta.2018.05.056
119. Magalhães LM, Barreiros L, Reis S, Segundo MA. Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2014;33(2):187-194. doi:10.1016/j.jfca.2014.01.003
120. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Min Y, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9/10):1231-1237.
121. Lima MJR, Tóth I V., Rangel AOSS. A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. *Talanta*. 2005;68(2):207-213. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.058
122. Fasano E, Bono-Blay F, Cirillo T, Montuori P, Lacorte S. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. *Food Control*. 2012;27(1):132-138. doi:10.1016/j.foodcont.2012.03.005
123. Otero P, Saha SK, Moane S, Barron J, Clancy G, Murray P. Improved method for rapid detection of phthalates in bottled water by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015;997:229-235. doi:10.1016/j.jchromb.2015.05.036
124. Wagner M, Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: Total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environmental Science and Pollution Research*. 2009;16(3):278-286. doi:10.1007/s11356-009-0107-7
125. Wu YT, Zhang YH, Zhang M, et al. Selective and simultaneous determination of trace bisphenol A and tebuconazole in vegetable and juice samples by membrane-based molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC. *Food Chem*. 2014;164:527-535. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.071
126. Alnaimat AS, Barciela-Alonso MC, Bermejo-Barrera P. Determination of bisphenol A in tea samples by solid phase extraction and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 2019;147:598-604. doi:10.1016/j.microc.2019.03.026
127. Li J, Cai Y, Shi Y, Mou S, Jiang G. Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta*. 2008;74(4):498-504. doi:10.1016/j.talanta.2007.06.008

128. Chang L, Bi P, Li X, Wei Y. Study of solvent sublation for concentration of trace phthalate esters in plastic beverage packaging and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 2015;177:127-133. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.013
129. Guo Z, Wei D, Wang M, Wang S. Determination of Six Phthalic Acid Esters in Orange Juice Packaged by PVC Bottle Using SPE and HPLC–UV: Application to the Migration Study. *J Chromatogr Sci.* 2010;48(9):760-765. doi:10.1093/chromsci/48.9.760
130. Li J, Cai Y, Shi Y, Mou S, Jiang G. Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta.* 2008;74(4):498-504. doi:10.1016/j.talanta.2007.06.008
131. Gao X, Yang B, Tang Z, et al. Determination of phthalates released from paper packaging materials by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2014;52(5):383-389. doi:10.1093/chromsci/bmt046

# ANEXOS

## Capítulo II

### “Método ORAC-SIA”



**Figura A2.1.** Procedimiento de ensayo ORAC implementado por el método de microplaca de 96 pocillos

**Tabla A2.1.** 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 ( $S_{PI}$ )            | $S_{PI} = \sqrt{\frac{CM_{entre\ días} - CM_{dentro\ de\ días}}{n\úm\ replicas}}$ |
| Desviación estándar relativa de la precisión intermedia ( $RSD_{PI}$ ) | $RSD_{PI} = \frac{S_{PI}}{promedio\ total} * 100$                                 |

**Tabla A2.2.** ANOVA para maximizar PP usando vainillina a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . DCC en 2 bloques con 3 puntos centrales

| Fuente                         | Suma de Cuadrados | GL | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|--------------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: [AAPH] <sup>a</sup>         | 3 667.57          | 1  | 3 667.57       | 121.83  | 0.00    |
| B: [fluoresceína] <sup>b</sup> | 149.50            | 1  | 149.50         | 4.97    | 0.06    |
| AA                             | 279.74            | 1  | 279.74         | 9.29    | 0.02    |
| AB                             | 6.79              | 1  | 6.786 02       | 0.23    | 0.65    |
| BB                             | 261.01            | 1  | 261.01         | 8.67    | 0.02    |
| bloques                        | 39.48             | 1  | 39.48          | 1.31    | 0.29    |
| Error total                    | 210.73            | 7  | 30.10          |         |         |
| Total (corr.)                  | 4 659.87          | 13 |                |         |         |

<sup>a</sup> Concentración en  $\text{mol L}^{-1}$ <sup>b</sup> Concentración en  $\mu\text{mol L}^{-1}$   
(GL)Grados de libertad**Tabla A2.3.** ANOVA para maximizar PP usando vainillina a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . DCC en 2 bloques con 3 puntos centrales

| Fuente            | Suma de Cuadrados | GL | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: [AAPH]         | 3 405.11          | 1  | 3 405.11       | 116.56  | 0.000 0 |
| B: [fluoresceína] | 14.22             | 1  | 14.22          | 0.49    | 0.507 9 |
| AA                | 1 227.77          | 1  | 1 227.77       | 42.03   | 0.000 3 |
| AB                | 1.22              | 1  | 1.22           | 0.04    | 0.843 8 |
| BB                | 185.10            | 1  | 185.10         | 6.34    | 0.040 0 |
| Bloques           | 127.80            | 1  | 127.80         | 4.37    | 0.074 8 |
| Error total       | 204.49            | 7  | 29.21          |         |         |
| Total (corr.)     | 5 100.33          | 13 |                |         |         |

**Tabla A2.4.** ANOVA para maximizar el PP usando vainillina a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . DFC 2<sup>2</sup> con 1 réplica

| Fuente                 | Suma de Cuadrados | GL | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: Volumen de aspirado | 192.37            | 1  | 192.37         | 4.13    | 0.134 9 |
| B: Caudal              | 4 066.67          | 1  | 4 066.67       | 87.39   | 0.002 6 |
| AB                     | 192.37            | 1  | 192.37         | 4.13    | 0.134 9 |
| Bloques                | 102.46            | 1  | 102.46         | 2.20    | 0.234 5 |
| Error total            | 139.61            | 3  | 46.54          |         |         |
| Total (corr.)          | 4 693.48          | 7  |                |         |         |

**Tabla A2.5.** ANOVA para maximizar el PR usando vainillina a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . DFC 2<sup>2</sup> con 1 réplica

| Fuente                 | Suma de Cuadrados | GL | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: Volumen de aspirado | 40.63             | 1  | 40.63          | 4.17    | 0.133 8 |
| B: Caudal              | 983.68            | 1  | 983.68         | 100.94  | 0.002 1 |
| AB                     | 40.63             | 1  | 40.63          | 4.17    | 0.133 8 |
| Bloques                | 21.03             | 1  | 21.03          | 2.16    | 0.238 2 |
| Error total            | 29.24             | 3  | 9.74           |         |         |
| Total (corr.)          | 1 115.22          | 7  |                |         |         |

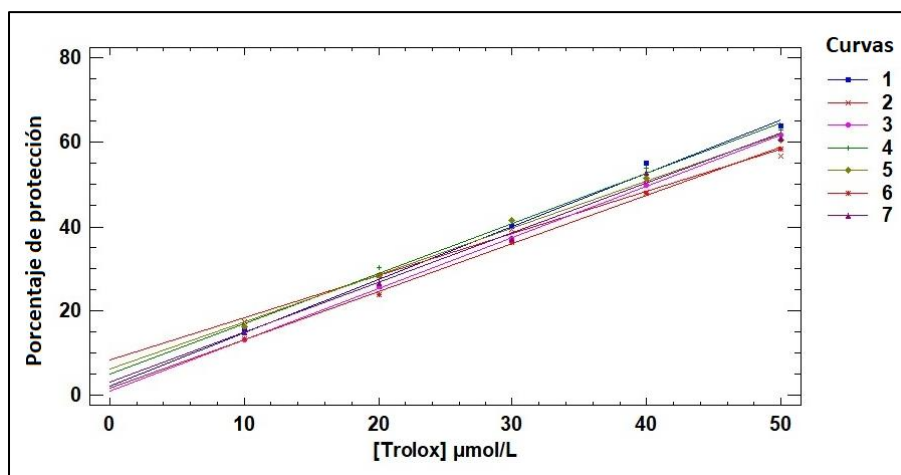


Figura A2.2. Curvas de calibración del estándar trolox para el método ORAC-SIA

Tabla A2.6. Parámetros estadísticos para cada una de las curvas de calibración de trolox preparadas durante siete días

| Curva | Intersección | Error   | pendiente | Error   | R <sup>2</sup> |
|-------|--------------|---------|-----------|---------|----------------|
| 1     | 2.143 0      | 1.992 6 | 1.261 9   | 0.060 1 | 0.993          |
| 2     | 8.253 0      | 1.808 7 | 1.004 9   | 0.054 5 | 0.991          |
| 3     | 1.048 0      | 0.259 6 | 1.214 6   | 0.007 8 | 0.999          |
| 4     | 4.920 0      | 2.011 2 | 1.193 2   | 0.060 6 | 0.992          |
| 5     | 6.097 0      | 1.706 3 | 1.117 1   | 0.051 4 | 0.994          |
| 6     | 1.685 0      | 0.766 6 | 1.143 1   | 0.023 1 | 0.999          |
| 7     | 3.121 0      | 1.859 7 | 1.182 7   | 0.056 1 | 0.993          |

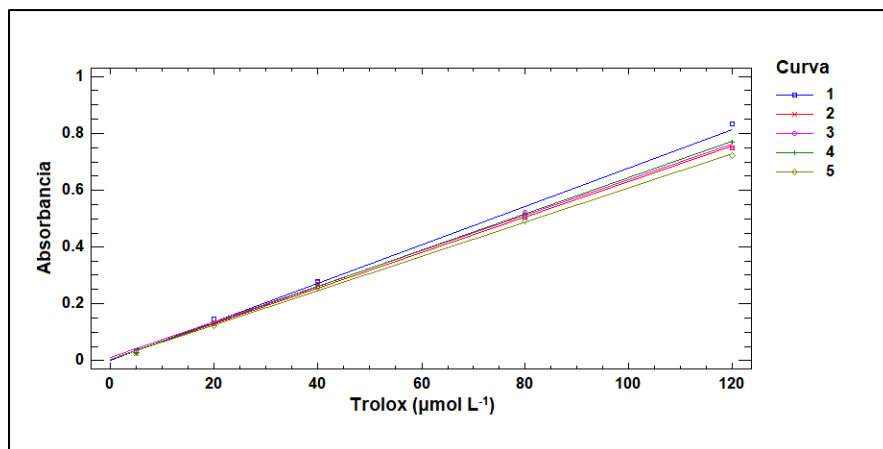
(R<sup>2</sup>) Coeficiente de determinación.

## “Método FRAP-SIA”

**Tabla A2.7.** ANOVA para maximizar la absorbancia registrada del método FRAP-SIA usando trolox a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . DCC en 2 bloques con 3 puntos centrales

| Fuente                                   | Suma de Cuadrados | GI | Cuadrado Medio | Razón-F  | Valor-P |
|--|-------------------|----|----------------|----------|---------|
| A: Concentración FRAP (%)                | 4.06E-05          | 1  | 4.06E-05       | 0.86     | 0.366 4 |
| B: Volumen de Aspirado ( $\mu\text{L}$ ) | 6.62E-02          | 1  | 6.62E-02       | 1 409.31 | 0.000 0 |
| C: Tiempo (s)                            | 6.67E-05          | 1  | 6.67E-05       | 1.42     | 0.250 7 |
| D: Caudal $\mu\text{L s}^{-1}$           | 2.88E-03          | 1  | 2.88E-03       | 61.40    | 0.000 0 |
| AA                                       | 2.88E-04          | 1  | 2.88E-04       | 6.13     | 0.024 9 |
| AB                                       | 1.21E-06          | 1  | 1.21E-06       | 0.03     | 0.874 5 |
| AC                                       | 3.14E-05          | 1  | 3.14E-05       | 0.67     | 0.425 7 |
| AD                                       | 1.19E-05          | 1  | 1.19E-05       | 0.25     | 0.621 4 |
| BB                                       | 1.17E-03          | 1  | 1.17E-03       | 24.87    | 0.000 1 |
| BC                                       | 9.61E-06          | 1  | 9.61E-06       | 0.20     | 0.657 0 |
| BD                                       | 4.22E-04          | 1  | 4.22E-04       | 9.00     | 0.008 5 |
| CC                                       | 5.33E-06          | 1  | 5.33E-06       | 0.11     | 0.740 4 |
| CD                                       | 5.63E-07          | 1  | 5.63E-07       | 0.01     | 0.914 2 |
| DD                                       | 1.97E-07          | 1  | 1.97E-07       | 0.00     | 0.949 2 |
| Bloques                                  | 4.38E-04          | 2  | 2.19E-04       | 4.67     | 0.025 3 |
| Error total                              | 7.51E-04          | 16 | 4.69E-05       |          |         |
| Total (corr.)                            | 7.22E-02          | 32 |                |          |         |

(GL)Grados de libertad

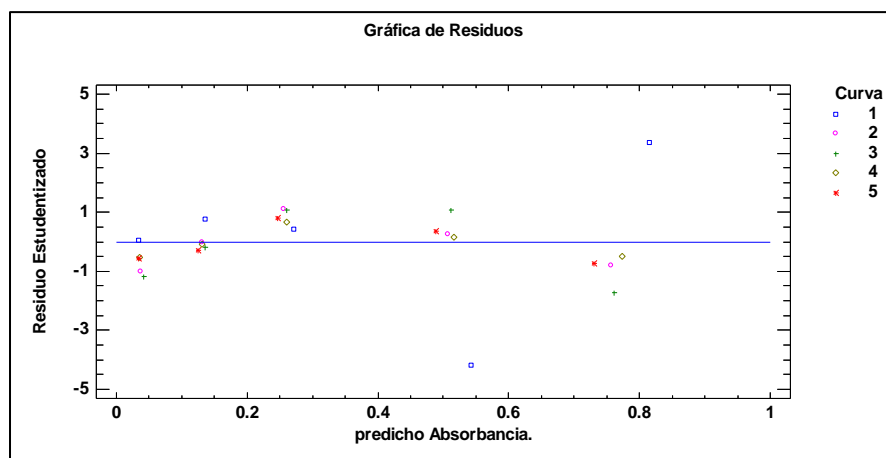


**Figura A2.3.** Comparación de las curvas de calibración de Trolox preparadas diariamente durante un periodo de 5 días de 5 a  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$

**Tabla A2.8.** Parámetros estadísticos para cada una de las curvas de calibración de Trolox preparadas durante un periodo de cinco días

| No. Curva | Ordenada al origen | Error     | Pendiente | Error     | R <sup>2</sup> |
|-----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| 1         | -0.000 33          | 0.017 731 | 0.006 79  | 0.000 262 | 0.996          |
| 2         | 0.005 73           | 0.007 973 | 0.006 27  | 0.000 118 | 0.999          |
| 3         | 0.011 12           | 0.010 926 | 0.006 26  | 0.000 162 | 0.998          |
| 4         | 0.003 47           | 0.004 740 | 0.006 41  | 0.000 070 | 0.999          |
| 5         | 0.004 55           | 0.006 151 | 0.006 04  | 0.000 091 | 0.999          |





**Figura A2.4.** Residuos en función de la concentración del estándar de Trolox para las regiones lineales de las curvas de calibración preparadas diariamente durante cinco días de 5 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Tabla A2.9.** Análisis de varianza de los datos obtenidos en la construcción de una sola curva de calibración

| Fuente   | Suma de Cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Razón-F  | Valor-P |
|----------|-------------------|----|----------------|----------|---------|
| Modelo   | 1.771 35          | 1  | 1.771 35       | 4 518.89 | 0.000 0 |
| Residual | 0.009 06          | 23 | 0.000 39       |          |         |
| Total    | 1.780 36          | 24 |                |          |         |

**Tabla A2.10.** Resultados de capacidad antioxidante en diferentes muestras alimenticias por el método propuesto FRAP-SIA y el método convencional por microplaca

| Muestras               | Capacidad antioxidante <sup>a</sup> |                          |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
|                        | Microplaca                          | SIA                      |
| Extracto de tomate     | 25 712.33 $\pm$ 7 314.15            | 21 031.53 $\pm$ 1 170.77 |
| Vino tinto carmenere   | 17 060.11 $\pm$ 3 180.62            | 13 324.38 $\pm$ 48.03    |
| Vino tinto merlot      | 16 332.37 $\pm$ 6 463.89            | 10 704.49 $\pm$ 235.31   |
| Extracto de té verde   | 13 193.98 $\pm$ 3 730.56            | 10 301.69 $\pm$ 1 107.85 |
| Extracto de café honey | 5 724.19 $\pm$ 2 156.34             | 4 930.91 $\pm$ 230.19    |
| Juego de arándano      | 4 394.27 $\pm$ 916.80               | 5 317.23 $\pm$ 63.54     |
| Jugo de uva-arándano   | 3 616.17 $\pm$ 1 208.20             | 3 320.60 $\pm$ 104.68    |
| Jugo de uva            | 1 427.26 $\pm$ 256.76               | 2 043.28 $\pm$ 367.81    |

<sup>a</sup> Expresado en  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Trolox.

**Tabla A2.11.** Valores de capacidad antioxidante para el estudio de precisión del método ORAC-SIA, a partir de un patrón trolox y una muestra de vino

| Día                   | Vino tinto carmenere<br>( $\mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox) |           |          | Trolox (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) |           |          |
|-----------------------|--|-----------|----------|-------------------------------------|-----------|----------|
|                       | Réplica 1  | Réplica 2 | Promedio | Réplica 1                           | Réplica 2 | Promedio |
| 1                     | 31.38  | 30.17     | 30.77    | 25.37                               | 25.35     | 25.36    |
| 2                     | 31.32  | 31.04     | 31.18    | 25.95                               | 26.77     | 26.36    |
| 3                     | 29.48  | 30.34     | 29.91    | 26.16                               | 25.73     | 25.94    |
| 4                     | 29.42  | 30.52     | 29.97    | 24.82                               | 26.04     | 25.43    |
| 5                     | 30.08  | 29.99     | 30.04    | 25.34                               | 25.90     | 25.62    |
| 6                     | 31.78  | 31.54     | 31.66    | 25.62                               | 24.36     | 24.99    |
| 7                     | 30.99  | 29.77     | 30.38    | 26.43                               | 26.63     | 26.53    |
| <b>Promedio total</b> |  |           | 30.56    |                                     |           | 25.75    |

**Tabla A2.12.** Resultados de capacidad antioxidante para el estudio de precisión del método FRAP-SIA, de usando trolox y vino tinto merlot

| Día                   | Vino tinto merlot 0.67 % |          |          | Trolox 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |          |          |
|-----------------------|--------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------|----------|
|                       | Réplica 1                | Réplica2 | Promedio | Réplica 1                        | Réplica2 | Promedio |
| 1                     | 67.05                    | 66.32    | 66.68    | 58.14                            | 59.91    | 59.03    |
| 2                     | 65.43                    | 64.76    | 65.09    | 57.98                            | 57.26    | 57.62    |
| 3                     | 66.79                    | 69.39    | 68.09    | 59.13                            | 60.33    | 59.73    |
| 4                     | 67.31                    | 69.39    | 68.35    | 59.55                            | 57.93    | 58.74    |
| 5                     | 67.67                    | 68.30    | 67.98    | 58.51                            | 60.17    | 59.34    |
| 6                     | 67.20                    | 66.47    | 66.84    | 57.62                            | 58.66    | 58.14    |
| 7                     | 67.67                    | 68.87    | 68.27    | 58.35                            | 58.87    | 58.61    |
| <b>Promedio total</b> |                          |          | 67.33    |                                  |          | 58.74    |

## Capítulo III

### “Método FRAP/ABTS-SIA”

**Tabla A3.1.** Resultados para la medición de la precisión de la cuantificación de capacidad antioxidante en Trolox y extracto de café honey para el ensayo FRAP por FRAP/ABTS-SIA

| Día | Extracto de café honey 0.5 % |           |          | Trolox 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |           |          |
|-----|------------------------------|-----------|----------|----------------------------------|-----------|----------|
|     | Réplica 1                    | Réplica 2 | Promedio | Réplica 1                        | Réplica 2 | Promedio |
| 1   | 50.70                        | 50.05     | 50.37    | 59.06                            | 60.49     | 59.77    |
| 2   | 49.22                        | 49.86     | 49.54    | 61.97                            | 62.48     | 62.22    |
| 3   | 48.88                        | 48.75     | 48.81    | 61.28                            | 61.02     | 61.15    |
| 4   | 47.22                        | 49.25     | 48.24    | 59.86                            | 61.41     | 60.63    |
| 5   | 48.30                        | 49.73     | 49.01    | 59.74                            | 59.74     | 59.74    |
|     | <b>Promedio total</b>        |           | 49.19    |                                  |           | 60.70    |

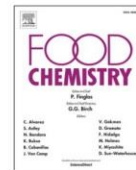
**Tabla A3.2.** Resultados para la medición de la precisión de la cuantificación de capacidad antioxidante en Trolox y extracto de café honey para el ensayo ABTS por FRAP/ABTS-SIA

| Día | Extracto de café honey 0.5 % |           |          | Trolox 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |           |          |
|-----|------------------------------|-----------|----------|----------------------------------|-----------|----------|
|     | Réplica 1                    | Réplica 2 | Promedio | Réplica 1                        | Réplica 2 | Promedio |
| 1   | 62.51                        | 61.35     | 61.93    | 59.46                            | 60.04     | 59.75    |
| 2   | 60.48                        | 61.06     | 60.77    | 58.59                            | 59.61     | 59.10    |
| 3   | 62.36                        | 61.64     | 62.00    | 60.77                            | 61.64     | 61.20    |
| 4   | 63.81                        | 63.52     | 63.67    | 57.58                            | 58.30     | 57.94    |
| 5   | 62.65                        | 62.94     | 62.80    | 59.17                            | 59.32     | 59.25    |
|     | <b>Promedio total</b>        |           | 62.23    |                                  |           | 59.45    |



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

Analytical Methods

## Fast ORAC-SIA method for antioxidant capacity determination in food samples

Willmann Antonio Jiménez-Morales<sup>a</sup>, María del Pilar Cañizares-Macias<sup>a,\*</sup>,  
José Pedraza-Chaverri<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico



## ARTICLE INFO

## Keywords:

SIA  
Antioxidant capacity  
ORAC  
Food samples  
AAPH  
Fluorescein

## ABSTRACT

A novel fluorescent ORAC-SIA method to determine antioxidant capacity in several food samples using fluorescein as the probe was developed. The optimization of the method was through a multivariable design, decreasing the analysis time to 5 min and the AAPH concentration to 67% compared with 90 min in the standard 96-well microplate method. The aspiration order was AAPH-sample/standard-fluorescein injected into a stream of a water-based carrier. The calculation of the antioxidant capacity was done from the fluorescein peak height, so neither delay time nor area measurement was necessary. The proposed method showed excellent precision (RDS < 3%) with a LOD of 3.13  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and recoveries from 90% to 107%. The results from the ORAC-SIA method did not show a significant difference from the microplate method.

## 1. Introduction

Antioxidants have become the essential compounds of the nutritional world, being significant for their ability to protect oxidative cell damage, which can lead to diseases such as Alzheimer's, cancer, heart conditions, among others (Rajendran et al., 2014). Therefore, it is relevant to know the importance that antioxidants play as substances that delay, prevent, or remove oxidative damage to a target molecule (Halliwell & Gutteridge, 2015; Pisoschi & Pop, 2015). Previous reports suggest that various endogenous and exogenous antioxidants neutralize free radicals and protect the body by maintaining redox balances (Pham-Huy et al., 2008). In addition, these antioxidants sometimes show a synergistic effect between them, resulting in an overestimation of their combined action (Antolovich et al., 2002; Sánchez-Moreno, 2002). The total antioxidant capacity (TAC) of foods sums the synergistic redox interactions between the proportions of all the molecules present in them (Pellegrini et al., 2003).

It is possible to identify an antioxidant compound in a sample and measure its concentration by various assays. Several methods, such as the ABTS<sup>+</sup> test (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical cation) (Miller et al., 1993; Re et al., 1999), the DPPH' (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) (Brand-Williams et al., 1995; Herald et al., 2012), the ferric reducing antioxidant power (FRAP) test (Benzie

& Strain, 1996; Jimenez et al., 2008), the electrochemical estimation of the total reducing capacity (Chevion et al., 2000), among others have been proposed to evaluate the antioxidant capacity; but they generally, consume a long analysis time, are limited by pH conditions and the solvent medium, and the sample type.

The oxygen radical absorption capacity test (ORAC) is one of the most widely used methods for estimating peroxyl radical scavenging capacity due to the similarity that it has with the mechanism of oxidative degradation of lipids (Cao et al., 1993; López-Alarcón & Denicola, 2013; Prior, 2015; Re et al., 1999). The ORAC method is based on a competitive kinetic reaction that involves a synthetic-free radical generator, an oxidative molecular probe, and an antioxidant. In this way, the oxidative degradation of a fluorescent molecule, like fluorescein, is measured after mixing it with a free radical generator such as AAPH. The fluorescence intensity is measured every minute for 90 min at environment conditions (pH 7.4, 37 °C). As the reaction progresses, the fluorescence intensity of fluorescein decays; on the other hand, when an antioxidant compound is added, the fluorescence decaying is inhibited. Data reduction from the ORAC assay is achieved by calculating the area under the kinetic curve (AUC) and net AUC (AUC sample – AUC blank), obtaining a standard curve by plotting the concentration of antioxidant standard and the AUC, and calculating the equivalents of the sample using the standard curve (Huang et al., 2005).

\* Corresponding author.

E-mail address: [pilarm@unam.mx](mailto:pilarm@unam.mx) (M.P. Cañizares-Macias).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132524>

Received 29 November 2021; Received in revised form 17 February 2022; Accepted 18 February 2022

Available online 22 February 2022

0308-8146/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Huang et al. in 2002 developed and validated an improved ORAC assay using fluorescein as a fluorescent probe and adapted it to a 96-well plate reader format, analyzing many samples. Despite improvements to the ORAC method, difficulties and limitations are still identified, such as the time delay between wells which produces a systematic error, causing statistically significant differences in the determination of TAC of antioxidant solutions depending on the position of its plate (Mellado-Ortega et al., 2017). There are modifications to the original ORAC method, using pyrogallol red as the oxidative probe and a spectrophotometer as a detector (Atala et al., 2013). However, fluorometric detectors are known to provide higher sensitivity compared to spectrophotometric ones. For this reason, applying flow analysis methodologies to determine antioxidant capacity gives significant advantages as the reproducibility of the time and the signal analytical, which are important characteristics when the measurement involves reactions with kinetic differences (Kurbanoglu et al., 2018; Lima et al., 2005; Magalhães et al., 2009; Martins et al., 2013; Poláček et al., 2004). Another feature is the computer control, which allows adjustable and flexible systems to the flow parameters without physical manipulation on the manifold (Kolev, 2008). However, the implementation of flow methodologies to determine antioxidant activity is not very exploited because the ORAC assay is a kinetic measurement that needs to be read each appropriate time until 90 min.

In 2016 Ramos et al., proposed a flow injection analysis (FIA) system to quantify antioxidant capacity by the ORAC method using pyrogallol red as the oxidative probe and UV/Vis detection. This method was novel but presented a lower sensitivity than the microplate method being necessary a delay time of reaction.

The sequential injection analysis (SIA) is the second generation of FIA techniques based on computer flow programming (Ruzicka & Marshall, 1990). Among the advantages of SIA can be highlighted that the manifold is universal and simpler than FIA. SIA manifolds fix the circulation of the liquids in different directions, being able to stop the flows at whatever time required (Cerdà et al., 1999). In FIA, the peristaltic pump is usually permanently in movement, the analytical measurements being or not carried out, giving rise to an inadequate reagent consumption, nevertheless in SIA, the system only performs when the reactions are required, so, the reduction in consumption of both samples and reagents is drastic about FIA.

In the present work, a novel SIA method to determine the antioxidant capacity by the ORAC assay using fluorescein as an oxidative probe, without delay times, and measuring the peak height is proposed. To our knowledge, there are no reports of the implementation of ORAC assay to SIA systems. The physicochemical and hydrodynamics parameters were selected using factorial and central composite designs. The quality of data, the linear range, LOD and LOQ, precision, and recoveries were determined, besides the correlation of the antioxidant capacity in both SIA and batch methods was demonstrated using the Trolox standard. The results of the analysis of different food samples – such as wines, juices, and vanilla and coffee extracts – were compared with those obtained by the standard microplate method to demonstrate the reliability of the proposed method.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and solutions

All used reagents were analytical grade. Fluorescein, 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), and Vanillin were purchased from Sigma-Aldrich and used for the determination of antioxidant capacity. A 0.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; pH 7 phosphate buffer solution (PBS) was prepared and stored at 4 °C for a maximum of 15 days.

A fluorescein stock solution (0.6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and Trolox stock solution (400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) were prepared in PBS and stored at 4 °C in the darkness. From the stock solutions, standard solutions to build the calibration curves were daily prepared. Also, a 0.05 mol  $\text{L}^{-1}$  AAPH solution in PBS

was used.

### 2.2. Samples and their treatment

The analyzed food samples were cranberry nectar, grape nectar, grape, and cranberry juice, apple nectar cranberry, carmenere red wine, and merlot red wine, as if as coffee beans (honey and washed coffee), and vanilla bean purchasing in local supermarkets from Mexico City. The samples were analyzed using the proposed ORAC-SIA method and the standard microplate ORAC method.

The vanilla extracts getting from vanilla beans by using a Maxidigest MX 350 focused microwave oven following the reported literature (Rojas-López & Cañizares-Macias, 2013). Briefly, 1 g of pure ground vanilla bean powder was left in 25 mL of a 70% ethanol/water solution, and then 150 W microwaves irradiation power was applied to the sample. Twenty cycles of 1 min of irradiation and a delay time of 3 min between them were carried out. After the extraction, the extracts were filtered and collected. For the coffee extracts, firstly, 0.9 g of ground coffee were weighted and left in 20 mL of distilled water at 87 °C under stirring for 5 min; then, they were filtered and collected. All samples were diluted in distilled water.

### 2.3. Construction of the ORAC-SIA manifold

Fig. 1 shows the schematic representation of the SIA manifold to determine the antioxidant capacity by ORAC. The solutions of reagents and samples were aspirated and propelled through a multi-position valve of 8 ports integrated into the FIALab SiChrom equipment. The manifold included a PEEK holding coil of 0.70 mm I.D. whose volume was 1 mL and a reservoir of 4 mL total volume for the carrier solution filling through the syringe pump. Teflon tubing of 0.70 mm I.D. to connect 1, 2, 3, 4, 5, and 8 ports with the reagents, sample, reactor coil, and detector were used. The carrier solution used to fill the reservoir was aspirated through a Teflon tubing of 3 mm I.D. connected to port 6 of the selection valve connected internally to port 7, wherefrom through a PEEK tubing of 1 mm I.D. the reservoir of 4 mL was filled with the carrier. The reaction of oxidation and protection was carried out in the reactor coil build with Teflon tubing of 0.7 mm I.D., having a final volume of 635  $\mu\text{L}$ , and submerged in a 280 series Thermo Scientific water bath. A Whatman polypropylene membrane filter of 47 mm of diameter and 0.45  $\mu\text{m}$  of pore size, placed on a flow extraction cell of stainless steel, was used to remove the produced gaseous nitrogen in the reaction. The detection system consisted of a Fialab photomultiplier tube fluorometer (PMT-FL) equipped with filters of emission and excitation ( $\lambda_{\text{ex}} = 486 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ ) and a Hellma flow cell of 10 mm of the optical path. The sequential injection programming was achieved by computerized control of the multi-position valve and the syringe pump incorporated into the equipment, using the FIALab for Windows 5.0 software.

### 2.4. Procedure of the proposed ORAC-SIA method

In the ORAC assay, the antioxidant capacity from the sample, reagent, or analyte depends on the intensity recorded by fluorescein, which decreases continuously because of the oxidation it undergoes when reacting with peroxy radicals (reactive AAPH). When there is an antioxidant compound, the decrease of the fluorescence signal is higher or lower depending on the powerful antioxidant. Therefore, the ORAC-SIA method consisted of two measurement steps: 1) decrease in fluorescein intensity by reaction with AAPH, and 2) protection of the fluorescein intensity by the presence of an antioxidant. Table 1 shows ORAC-SIA programming. At first, the water-distilled carrier (step 1) filled the syringe pump; then, AAPH, fluorescein, and the antioxidant sample were sequentially aspirated into the holding coil (steps 2–4). Then, the bolus formed in the holding coil was dispensed into the reactor coil (635  $\mu\text{L}$ ), immersed in a water bath at 70 °C (step 5) to carry out the

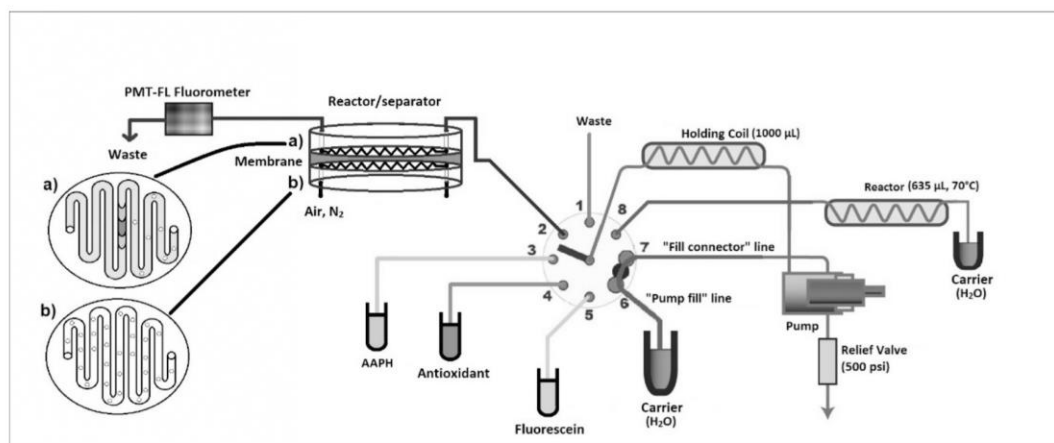


Fig. 1. Schematic representation of the sequential injection system to evaluate antioxidant capacity by the ORAC method.

Table 1

Programming of the SIA system to evaluate antioxidant capacity by ORAC using the manifold of the Fig. 1.

| Step | Action  | Injection valve (port) | Description   | Pumping flow rate <sup>a</sup> | Flow direction | Time (s) |
|------|---|------------------------|---|--------------------------------|----------------|----------|
| 1    | Pump filling                                    | 6                      | The pump was filled with 3.5 mL of water.                   | 50                             | Reverse        | 70       |
| 2    | Aspirated AAPH 0.05 µmol L <sup>-1</sup>        | 3                      | 10 µL of AAPH reagent was aspirated to holding coil.        | 10                             | Reverse        | 1        |
| 3    | Aspirated antioxidant                           | 4                      | 10 µL of Antioxidant was aspirated to holding coil          | 10                             | Reverse        | 1        |
| 4    | Aspirated fluorescein 2.25 µmol L <sup>-1</sup> | 5                      | 10 µL of Fluorescein reagent was aspirated to holding coil. | 10                             | Reverse        | 1        |
| 5    | Dispensed to reactor                            | 8                      | 400 µL was dispensed from holding coil to reactor.          | 20                             | Forward        | 20       |
| 6    | Aspirated to holding coil                       | 8                      | 600 µL was aspirated from reactor to holding coil.          | 20                             | Reverse        | 30       |
| 7    | Dispensed to detector                           | 2                      | 3 730 µL was dispensed from holding coil to detector.       | 20                             | Forward        | 186.5    |

<sup>a</sup> Flow rate in µL s<sup>-1</sup>.

oxidation/protection reaction. Then 400 µL was drawn into the holding coil (step 6); and finally, the entire volume contained in the holding coil was dispensed towards the detector, passing firstly, a reactor-separator cell where through a polypropylene membrane (step 7) gaseous nitrogen formed during the peroxy radical reaction is removed. The fluorescein signal was measured using emission and excitation filters of 486 nm and 500 nm, respectively.

#### 2.4.1. Determination of the antioxidant capacity

To quantify the antioxidant capacity, the maximum intensity of the SIA peak (analytic signal) of fluorescein when antioxidant compound/sample is aspirated together with fluorescein and AAPH was measured and subsequently transformed to protection percentages using two reference blanks: signal of fluorescein without AAPH (B1) and signal of fluorescein with AAPH (B2). The protection percentage (%PP) value was defined as the protection degree of fluorescein intensity with AAPH when aspirating a defined antioxidant concentration using the mathematical expression:

$$\%PP = \frac{I_S - I_{B2}}{I_{B1} - I_{B2}} \times 100 \quad (1)$$

where  $I_S$  represents the signal intensity after the reaction between sample, AAPH, and fluorescein;  $I_{B1}$  and  $I_{B2}$  correspond to intensities of the fluorescein blank signals without and with AAPH, respectively. To calculate the reaction percentage (%RP), the calculated protection percentage (%PP) was subtracted to 100%.

#### 2.5. Preliminary studies to build the experimental designs

A few preliminary studies to select the values more adequate of the

physical and chemical parameters of the SIA manifold were performed. The antioxidant standard chosen for the optimization was vanillin because it is a moderate antioxidant besides cheap and easy to manipulate.

##### 2.5.1. Determination of the dispersion coefficient.

Before starting the optimization of the ORAC-SIA method, a first analysis aspiring sequentially 10 µL of each reagent (water, PBS, and fluorescein) at a flow rate of 20 µL s<sup>-1</sup> was carried out to calculate the Ruzicka dispersion coefficient (Ruzicka & Marshall, 1990). This parameter established the best concentration and the aspiration volume of fluorescein for a detectable and unsaturated fluorescent intensity (peak). At first, the fluorescence signal of fluorescein solutions at concentrations from 0.3 to 15 µmol L<sup>-1</sup> was measured using a cell of 1 cm of optical length pass and a fluorimeter equipped with two filters at  $\lambda_{ex} = 486$  nm and  $\lambda_{em} = 500$  nm. From the linear equation graphing fluorescence units (URF) versus fluorescein concentration, one fluorescein solution at 12 µmol L<sup>-1</sup> was aspirated to calculate the dispersion coefficient in the ORAC-SIA manifold interpolating the fluorescence signals in the equation calculated in the batch plot.

##### 2.5.2. Evaluation of the reaction between fluorescein and AAPH

One of the most relevant parameters in the ORAC method is the kinetic reaction between AAPH and fluorescein and how an antioxidant compound delay the exhaustive chemical reaction between them. Different concentrations of fluorescein and AAPH to result in the best conditions and reach a complete chemical reaction were studied. Although the SIA equipment allowed aspirating volumes below 5 µL, it was decided to start with 10 µL not affect the method sensitivity. At first, AAPH concentrations from 0.01 to 0.15 mol L<sup>-1</sup> aspirating volumes from



10 to 30  $\mu\text{L}$ , and fluorescein concentrations of 1.8 and 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (10  $\mu\text{L}$  of aspiration volume) were carefully evaluated. The studied temperatures were from 37 °C to 70 °C, stopping it for 30 s in the reactor coil. The aspiration sequence used for these tests was water-AAPH-fluorescein at a flow rate of 20  $\mu\text{L s}^{-1}$ . These tests allowed to establish the experimental conditions to reach 100% of reaction for AAPH and fluorescein.

### 2.5.3. Determination of the aspiration sequence of ORAC-SIA system

In a SIA system, reagents and samples are sequentially aspirated, and the sequence depends on the expected analytical response being crucial for the reaction between them. The chemical reaction also depends on the diffusion of each aspirated zone. So, the fluorescein diffusion zone must be suitable for the reaction between AAPH and the antioxidant.

For the evaluation of the aspiration sequence of the SIA system were proposed the following sequences: 1) antioxidant-AAPH-fluorescein; 2) antioxidant-fluorescein-AAPH; 3) fluorescein-AAPH-antioxidant; 4) fluorescein-antioxidant-AAPH; 5) AAPH-fluorescein-antioxidant and 6) AAPH-antioxidant-fluorescein, using vanillin standards at 25 and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  as antioxidant and water for the blank signal. The highest protection percentage (%PP) determined the best aspiration sequence. For these experiments, an aspiration volume of 10  $\mu\text{L}$  for each solution, 0.05  $\text{mol L}^{-1}$  AAPH and 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  fluorescein solutions, a reaction temperature of 70 °C, a flow rate of 20  $\mu\text{L s}^{-1}$ , and stopping the flow of 30 s was used.

### 2.6. Study of optimization of the physicochemical parameters for the ORAC-SIA method

The optimization of the ORAC-SIA manifold was carried out using different experimental designs using the results of the previous tests. The programming sequence is shown in Table 1.

#### 2.6.1. AAPH and fluorescein concentrations

A central composite design (CCD) of 2 blocks and 3 central points with a total of 14 experiments was constructed to optimize the reaction between fluorescein and AAPH and obtain the best values of %PP and %RP.

The low- and high-level concentrations were 0.05 and 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  for AAPH and 1.5 and 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for fluorescein. The response variables were the %PP using vanillin at 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  as antioxidant standard. The experiments were fixed with an aspiration volume of 10  $\mu\text{L}$  for each solution, a reaction temperature of 70 °C, a flow rate of 20  $\mu\text{L s}^{-1}$ , an aspiration sequence (AAPH-antioxidant-fluorescein) and 30 s stopping the flow.

#### 2.6.2. Flow rate and injection volume

The evaluation of the flow rate and aspirated volume was through a 2<sup>2</sup> factorial experimental design (FED) of one replicate and 8 experiments. Concentrations at 0.05  $\text{mol L}^{-1}$  for AAPH, 2.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for fluorescein, and 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for vanillin were fixed. The volumes of reagents and samples were a single factor; thus, the maximum and minimum values were 5 and 10  $\mu\text{L}$ . Low and high levels of 5 and 20  $\mu\text{L s}^{-1}$  were used for the flow rates. The response variables for these experiments were %RP and %PP. The fix parameters were a reaction temperature of 70 °C, an aspiration sequence (AAPH-antioxidant-fluorescein) and 30 s stopping the flow.

#### 2.6.3. Evaluation of the flow stopping in the reactor coil

In the ORAC batch and microplate methods, the fluorescence intensity is measured every minute for 35 min or 90 min, respectively. As the reaction progresses, fluorescein is consumed, and intensity decreases. Based on this reaction principle, it was decided to evaluate when the reagents (fluorescein and AAPH) reached the reactor coil to stop the flow at different times.

Based on this reaction principle, it was decided to evaluate delay

times (stopping the flow rate) when the reagents reached the reactor coil. The delay times of the flow rate were 30 s, 20 s, 10 s, and 0 s, and the response variable was %RP between reagents. The fluorescein and AAPH concentrations used were 2.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 0.05  $\text{mol L}^{-1}$ , respectively, and a flow rate of 20  $\mu\text{L s}^{-1}$ . An aspiration volume of 10  $\mu\text{L}$  for each reagent, a reaction temperature of 70 °C, and the aspiration sequence AAPH- distilled water -fluorescein were fixed.

### 2.7. Statistical parameters

Once selected the best reaction conditions by the ORAC-SIA method, the characteristics of this as precision, detection limit, and linear equation, among others, were calculated. All the experiments used Trolox as an antioxidant standard because the results of antioxidant capacity were expressed in equivalent  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Trolox as reported in the literature.

#### 2.7.1. Calibration curves

Data analysis was done by (1) calculating of %PP of SIA peaks, (2) obtaining a calibration curve by plotting the concentration of Trolox standard and %PP, and (3) calculating the  $\mu\text{mol L}^{-1}$  trolox equivalents of a sample using the calibration curve.

Thus, calibration curves were constructed for seven days using Trolox, as standard, in concentrations between 10 and 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and plotting versus %PP. Finally, an average calibration curve was built, establishing the error in slope and intersection. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were estimated considering the error of the linear regression (Sy/x) and the slope (b) from the average calibration curve (Miller and Miller, 2010).

#### 2.7.2. Intermediate precision

A Trolox solution of 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and a Carmeneré (0.2 %) wine aqueous solutions were prepared and measured (using an average calibration curve) in duplicate for seven days. The antioxidant capacity was quantified in each solution expressing the results in equivalent  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Trolox. A one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the precision of the methodology was performed (FDA, 2019; Miller and Miller, 2010).

#### 2.7.3. Recoveries study

The recovery percentages were calculated from four samples analyzed previously. The samples were: 0.66% cranberry juice, 0.05% Carmeneré red wine, 0.05% vanilla extract, and 0.06% coffee extract. At first, the antioxidant capacities of the samples were measured in triplicate, and later different volumes of Trolox solutions at the following concentrations 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , and 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  were added to samples, again measured in triplicate. The recoveries using the following equation were calculated (AOAC International, 2019; FDA, 2019):

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Recovered concentration}}{\text{Added concentration}} \times 100 \quad (2)$$

### 2.8. Microplate standard method

A Cytation 3 Biotek fluorescence microplate reader with an excitation filter at 485 nm and an emission filter at 528 nm was used to carry out the ORAC assay by the standard method. The microplate reader has incorporated a temperature controller, which allows fixing the temperature at 37 °C. The Gen5 software (Bio-Tek Instruments) controls the equipment. The microplate reader is configured to measure a 60-well working zone for each 96-well microplate. Briefly, the analytical procedure by according to a report by Huang et al. (2002), was, 200  $\mu\text{L}$  of the reaction mixtures, compounded by 150  $\mu\text{L}$  of a 0.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$  fluorescein solution, 25  $\mu\text{L}$  of the sample or standard (Trolox in a range from 10 to 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), and 25  $\mu\text{L}$  of a 0.153  $\text{mol L}^{-1}$  AAPH solution, were



placed for 90 min at 37 °C. A 0.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$  PBS solution at pH 7 replaced the samples or standards Trolox and AAPH solution for control solutions. Data analyses were by calculating the AUC of two blanks (B1 and B2) and the AUC of sample/standard according to the trapezoid method. In this way, it was possible to determinate %PP using Eq (3). A calibration curve by plotting the concentration of Trolox standard and %PP was built. The  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Trolox equivalents of a sample were calculated using the calibration curve.

$$\%PP = \frac{AUC_s - AUC_{B2}}{AUC_{B1} - AUC_{B2}} \times 100 \quad (3)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Preliminary studies for the optimization of the ORAC-SIA method

Some preliminary analyses were necessary to find the best conditions for the ORAC-SIA analysis. These were the dispersion in the SIA system from the reagents and sample, the reaction conditions between the fluorescein and AAPH reagents, the aspiration sequence, and the reaction temperature. These studies were carried out simultaneously, but they are presented separately.

##### 3.1.1. Determination of the ORAC-SIA dispersion

The physical dilution process from the injected fluorescein is associated with the mathematical relationship of fluorescein concentrations before (Co) and after (C) the transport process occurs within the SIA system (Ruzicka & Marshall, 1990). The dispersion in the ORAC-SIA manifold using a fluorescein concentration at 12  $\mu\text{mol L}^{-1}$  was calculated with a dispersion coefficient of  $40.35 \pm 0.59$ . So, the minimum fluorescein concentration to use in the ORAC-SIA manifold was 1.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , corresponding to a peak with an approximate height of 8 thousand URF.

##### 3.1.2. Evaluation of the temperature for the reaction between fluorescein and AAPH

The principal challenges in the ORAC-SIA method were to achieve rapid oxidation of fluorescein by the AAPH-derived peroxy radicals and remove the gaseous nitrogen produced during the reaction between them. The 96-well plate ORAC method and other standard ORAC methods use 37 °C as the optimal reaction temperature but, if the temperature rises, peroxy radicals do, being faster the oxidation of fluorescein than by the conventional method. The results showed an exhaustive reaction between AAPH and fluorescein at 70 °C in a short time. This increase caused had more gaseous nitrogen quantity in less time. Even at 37 °C, the gaseous nitrogen formation was considerable and interfered in the fluorescent measurement. The incorporating of a gas diffusion cell, coupled with a polypropylene membrane, removed gaseous nitrogen allowing to measure the signal fluorescent without interferences. After overcoming this interference, it was possible to set the reactor temperature to 70 °C. As the temperature increased, energy was provided to the reaction system, reducing the activation energy required to carry out the reaction and increasing the rate. Due to this, it was possible to reduce the initial concentration of 0.15 mol L<sup>-1</sup> of AAPH from microplate method (Huang et al., 2002) to 0.05 mol L<sup>-1</sup>, and it was necessary to increase the fluorescein minimum concentration from 1.8 to 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , for obtaining peaks of fluorescein without interference from equipment noise. Although the reaction was exhaustive under the mentioned conditions, the flow was stopped for 30 s and maintained it until optimization of the method.

##### 3.1.3. Aspiration sequence

The highest values of antioxidant protection were for the sequence AAPH-antioxidant-fluorescein. For concentrations at 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of vanillin, the protection percentage values were 37.50% and 96.88%, respectively. As the antioxidant solution was at the

beginning or at the end the of the sequence, the %PP was between 25 and 37.5% for vanillin 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 70.37 to 87.50% for vanillin 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The position of the antioxidant solution avoided that AAPH could react with fluorescein before the antioxidant.

On the other hand, to quantify the antioxidant capacity of a sample/standard, it was necessary to know the signals corresponding to the reaction. In this way, the fluorescent intensity from fluorescein without AAPH was B1, and B2 indicated the maximum decay of fluorescein by its reaction with AAPH (0% protection). As an antioxidant compound is aspirated into the SIA manifold, together with AAPH and fluorescein, the fluorescein signal height depends on its strength as an antioxidant. If the antioxidant does not protect, the SIA signal will be closer to B2.

#### 3.2. Optimization of the ORAC-SIA method using factorial designs

The best results for the reagents concentration, the flow rate, and the aspiration volumes were determined from a factorial design and a central compound design (CCD). Data analysis was performed with Statgraphics software using an ANOVA test at the 95% confidence level to maximize the protection percentage (%PP).

##### 3.2.1. Concentration of reagents

The ORAC assay methodology is based on the oxidative degradation of fluorescein when it reacts with AAPH before and after adding an antioxidant sample. Therefore, the concentrations of the reagents using a CCD of 2 blocks and three central points to maximize the %PP using vanillin at 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  as antioxidant standards were determined. Table SM1 of the Supplementary Material shows the data.

The Pareto chart of standardized effects showed a level of significance of 95%, the influence positive or negative of each factor in the response variable, being statistically significant those factors localized above the line perpendicular to the bars. The effects of each factor from their binary interactions, since they better fit the regression model, were considered. Using a 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  vanillin solution as the antioxidant standard, it was observed that both concentrations of reagents had a significant influence on the response (%PP), thus establishing that at a high concentration of AAPH and low concentration of fluorescein, the % PP was higher than other combinations (See Fig. SM1, SM2, and SM3 of the Supplementary Material).

The analysis of variance (ANOVA) results for each factor indicated that the AAPH concentration had a significant influence in the experiment ( $P$ -value < 0.05) (Tables SM2 and SM3 of the Supplementary Material). The experimental results of %PP were plotted versus the values predicted using the model. The  $R^2$  values were 95.48% and 95.99% for vanillin 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively, indicating a good fit between the experimental values with those obtained by the regression models.

At 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of vanillin, it was more evident for effect in the concentrations of fluorescein and AAPH, indicating that at a low concentration of both reagents %PP increased. Therefore, the best reagents concentrations to determine the antioxidant capacity were 2.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for fluorescein and 0.05 mol L<sup>-1</sup> for AAPH.

##### 3.2.2. Flow rate and aspiration volumes

In an SIA system, it is essential to know adequately the flow rate to perform an analysis because it is necessary to establish a compromise between the chemical reaction and dispersion and that the analysis times are not too long. The volume aspirated also is relevant because, although small volumes allow to reduce costs and be eco-friendly by reducing waste, also be able to increase the errors reducing the precision in some cases. So, it is crucial to find the best values for each parameter in each methodology developed. So, a FED (2<sup>2</sup>) with one replicate to evaluate and optimize the effect of the factors (flow rate and aspirated volume) was used. The evaluation was based on the highest values for % PP and %RP, using vanillin 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Table SM4 of the Supplementary Material shows the factorial design.



The ANOVA results shown in [Tables SM5 and SM6 Supplementary Material](#) showed that only the flow rate had a significant influence on both response variables (%PP and %RP), without interaction with the aspirated volume. The experimental results of %PP and %RP were plotted versus the values predicted using the model. Two regression equations with the best fit to a quadratic model were obtained. The  $R^2$  values for both models were 97.03 and 97.38% for %PP and %RP, respectively, indicating a good fit between the experimental values with those obtained by the regression models. The Pareto charts of standardized effects showed that the %PP increases at high flows rates, but the %RP decreases ([Fig. SM4 and SM5 of the Supplementary Material](#)). It was also observed that when the reagents and sample volumes increased, the %PP and %RP do. For the response variable of %RP the flow rate at  $5 \mu\text{L s}^{-1}$  was the optimal value causing prolonged analysis times but reducing the %PP value. Therefore, the optimal values were calculated from the design that maximized the %PP, resulting in  $20 \mu\text{L s}^{-1}$  for the flow rate and  $10 \mu\text{L}$  for the aspirated volume. These volumes are almost 10 times lower than those for the microplate method.

### 3.3. Evaluation of the delay time to evaluate the reaction between AAPH and fluorescein (B2 blank)

The antioxidant capacity by ORAC–microplate assay is calculated by plotting kinetic curves – time versus fluorescence intensity – after a delay time of 90 min. The trapezoid method subtracting the AUC without antioxidant to AUC with an antioxidant is used. However, this measurement is complex and time-consuming; to solve this problem, we propose to measure the height of the SIA peaks to calculate the %PP and %RP. It is possible because the physical dispersion and the measurement in the kinetic part of the chemical reaction is the fundament of the SIA systems.

First, the analysis of delay times in the range from 0 to 30 s was carried out using %RP as a response calculated from the height of the SIA peaks from the reaction between AAPH and fluorescein without an antioxidant. There were no significant differences in the %RP value in the range analyzed with 100% of reaction (vanishing of fluorescein peak) between them. Also, the %PP using different concentrations of Trolox showed that increasing the Trolox solution concentrations the height of the peaks also does, and they are proportional directly to the intensity of the signal. So, the waiting time in the reactor was not necessary to perform the analysis, being easier to determine %RP from the SIA peaks than by AUC. It is because the flow-based methods allow detections in a part of the reaction kinetics of the analysis without requiring reaching a chemical or physical equilibrium.

The ORAC methods previously reported need a delay time to establish 100 % of reaction between AAPH and fluorescein (B2).

### 3.4. Characteristic of the ORAC-SIA method

With the values of the chemical and hydrodynamic parameters of the ORAC-SIA method selected, the characteristics of this as linear range, regression coefficient, and precision were determined from plotting %PP versus Trolox concentration.

#### 3.4.1. Calibration curve and linear range

The %PP was the response for evaluating the protection capacity of an antioxidant to protect fluorescein in front of AAPH, by the results must be expressed in equivalents of  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of Trolox (or any other antioxidant). Seven calibration curves were constructed, and using an analysis of variance (ANOVA) of the data it was demonstrated a directly proportional relationship between the response (%PP) and the concentration of Trolox standards at 95% significance ( $P < 0.05$ ) ([Table SM7, Supplementary Material](#))

The average curve ([Fig. SM6, Supplementary material](#)) constructed with the data from the seven calibration curves showed a homoscedastic variance and excellent linearity in a concentration range from  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$

to  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  with a determination coefficient of 0.997. The regression equation showed a slope of  $1.15 \pm 0.02$  and an intersection of  $3.89 \pm 0.89$ . The LOD and LOQ were 3.13 and  $9.48 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively, enhancing the sensitivity of this assay compared to previous reports by flow-based methods for determination of capacity antioxidant ([Meanha et al., 2015](#); [Ramos et al., 2016](#); [Ribeiro et al., 2011](#)).

#### 3.4.2. Precision and recoveries

The repeatability and intralaboratory reproducibility expressed as relative standard deviation were 1.96% and 2.60% for Carmenerie wine and 2.15% and 2.65% for Trolox, respectively ([Table SM8, Supplementary Material](#)).

Recoveries values ranged from 86.90 to 107.50% for the fortified samples (blueberry juice, vanilla extract, coffee extract and carmenere wine) with trolox from 10 to  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  ([Table 2](#)). According to the AOAC criteria ([AOAC International, 2019](#)), mostly these values are within the acceptable ranges for intermediate precision ( $\leq 3\%RSD$ ) and recovery (85–110%). The results indicated that there are no significant interferences of the matrix.

### 3.5. Correlation between the ORAC-SIA method and microplate method

[Fig. 2](#) shows the preparation of the 96-well microplate from two blanks (B1 and B2), Trolox standards, to construct the calibration curve, and finally, the food samples being all experiments performed in triplicate. The ORAC microplate method got a calibration curve with a linear range from  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  to  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , a slope of  $1.29 \pm 0.05$ , the intersection of  $4.17 \pm 1.57$ , LOD of  $3.82 \mu\text{mol L}^{-1}$ , and LOQ of  $11.57 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The obtained results were similar to those reported in the literature ([Huang et al., 2002](#)). The obtained %PP by the SIA method and the microplate were plotted getting a correlation higher than 99% and proving that the sensitivity was similar. In [Table 3](#), a comparison of regression values from other methods (FIA, SIA, and microplate) reported in the literature to determine antioxidant capacity shows that data of the proposed method has a lower %RSD than ORAC-microplate ([Huang et al., 2002](#)), indicating excellent precision; and better sensitivity than the ORAC-FIA method ([Ramos et al., 2016](#)).

On the other hand, it notes that the other methods to determine antioxidant capacity by flow systems have lower sensitivities than their counterparts by microplate. In the case of the ORAC-FIA method reported in 2016, we can observe that its sensitivity decreased 5 times compared to the microplate method, due to the change of fluorescence detection by spectrometric detection. In this way, our proposed ORAC-SIA method presents a notable improvement of sensitive 4-fold concerning the first flow method reported in 2016 for an ORAC assay.

### 3.6. Application of ORAC-SIA method to food samples

Several food samples were analyzed, and the results compared with those obtained by the microplate method ([Huang et al., 2002](#)). [Table 4](#) shows the results expressing the results in  $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$  of the sample. After performing a statistical student's *t*-test for paired data, at 95% reliability ( $\alpha$  of 0.05 at two tails), the methods had no significant differences in their results ( $t_0 = 0.84$  and  $t_c = 2.26$ ), showing the reliability of the proposed ORAC-SIA method. In this way, the proposed method does not need a long analysis time to reach the equilibrium of the reaction, being possible to quantify the antioxidant capacity by measuring only part of the reaction kinetics without affecting the measurement. In [Fig. SM7 of Supplementary material](#) is shown the signal obtained of fluorescein, alone, with AAPH and with sample.

## 4. Conclusions

The proposed method is the first flow method for an ORAC methodology using fluorescein as a probe. The advantages of the proposed method included: the reduction of 1) volumes of reagents and sample, 2)

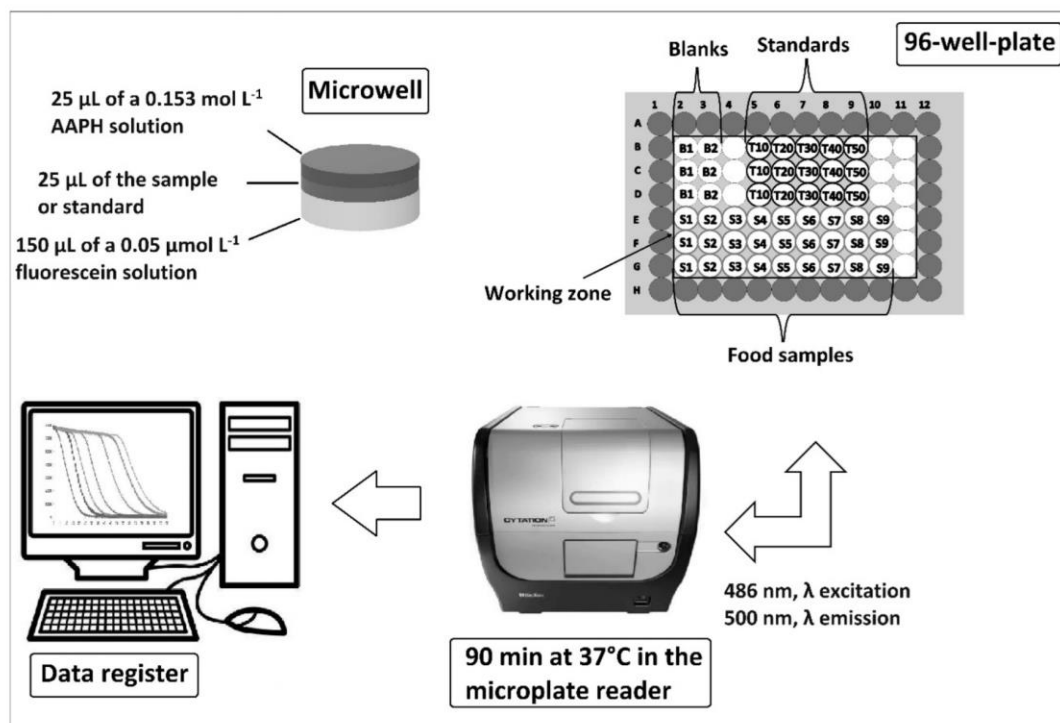
**Table 2**

Recovery percentages for 4 samples added with different concentrations of Trolox. The recovery reference values by AOAC international are from 85 % to 110% (AOAC International, 2019). Concentration expressed in  $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ .

| Sample                      | Antioxidant capacity of sample <sup>a</sup> | Added concentration <sup>a</sup> | Concentration of added sample <sup>a</sup> | Recovered concentration <sup>a</sup> | Recovery percentage |
|-----------------------------|---|----------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------|
| Blueberry juice at 0.66%*   | 11.41                                       | 20.00                            | 30.33                                      | 18.92                                | 94.61               |
|                             |   | 30.00                            | 42.74                                      | 31.33                                | 104.42              |
|                             |   | 40.00                            | 51.76                                      | 40.35                                | 100.87              |
| Red wine Carmeneré at 0.05% | 12.73                                       | 10.00                            | 22.97                                      | 10.24                                | 102.41              |
|                             |   | 20.00                            | 32.85                                      | 20.12                                | 100.60              |
|                             |   | 30.00                            | 43.33                                      | 30.60                                | 102.02              |
|                             |   | 40.00                            | 52.76                                      | 40.03                                | 100.08              |
| Vanilla extract at 0.05%    | 22.94                                       | 10.00                            | 33.48                                      | 10.54                                | 105.37              |
|                             |   | 20.00                            | 42.48                                      | 19.54                                | 97.70               |
|                             |   | 30.00                            | 52.42                                      | 29.48                                | 98.26               |
|                             |   | 40.00                            | 58.36                                      | 35.42                                | 88.54               |
| Coffee extract at 0.06%     | 16.41                                       | 10.00                            | 25.10                                      | 8.69                                 | 86.90               |
|                             |   | 20.00                            | 35.99                                      | 19.57                                | 97.87               |
|                             |   | 30.00                            | 47.71                                      | 31.29                                | 104.30              |
|                             |   | 40.00                            | 59.41                                      | 43.00                                | 107.50              |

\* For concentrations higher than 0.1%, the reference values are 90–108%.

<sup>a</sup> Expressed in  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Trolox.



**Fig. 2.** ORAC assay by a 96-well-plate reader. It is shown the filled with the microwells and the preparation of the 96-well microplate. Blank 1 (B1) was prepared from 150  $\mu\text{L}$  of a  $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$  fluorescein solution and 50  $\mu\text{L}$  of a  $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$  PBS solution at pH 7. Blank 2 (B2) from 150  $\mu\text{L}$  of a  $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$  fluorescein solution, 25  $\mu\text{L}$  of a  $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$  PBS solution at pH 7, and 25  $\mu\text{L}$  of a  $0.153 \text{ mol L}^{-1}$  AAPH solution. T10, T20, T30, T40 and T50 are the microwells for the standards solutions of Trolox of 10, 20, 30, 40 and 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively, and S1-S9 correspond the microwells for food samples. All experiments were performed in triplicate, and they are marked with the same number for each analysis.

AAPH reagent concentration, 3) measurement errors, and 4) analysis time by sample. At a temperature of  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  in the reactor, high energy was provided to the reaction system, reducing the activation energy and increasing the rate; so, the reaction time decreased from 90 min, by the microplate method, to 5 min with a sampling frequency of 12 food samples an hour. Another excellent advantage is that the kinetic performance of the SIA system allows rapid and straightforward data treatment, measuring the peak intensities instead of areas. In addition,

the SIA-ORAC system showed excellent precision and recoveries coinciding with the international norms values and better than the microplate method.

The proposed ORAC-SIA configuration is eco-friendly and shows extraordinary potential as an alternative methodology for quantifying the antioxidant capacity of food samples for its implementation in the food industry.

Although the microplate method is attractive in the sampling



**Table 3**

Comparison of the characteristics between the proposed ORAC-SIA method with different published methods to determine the antioxidant capacity.

| Method              | LOQ <sup>a</sup> | m     | Linear range <sup>a</sup> | Standard     | r     | %RSD <sub>r</sub> | %RSD <sub>e</sub> | Ref.                   |
|---------------------|------------------|-------|---------------------------|--------------|-------|-------------------|-------------------|------------------------|
| ORAC - microplate   | 5                | 1.5   | 6.25–50                   | Trolox       | 0.999 | < 15%             | < 15%             | (Huang et al., 2002)   |
| DPPH - microplate   | N.R              | 0.15  | 50–500                    | Trolox       | 0.999 | 1.06 – 8.28%      | 1.32 – 2.13%      | (Herald et al., 2012)  |
| CUPRAC - microplate | 3                | 7.11  | 12.5–200                  | Uric acid    | 0.999 | 1.00%             | 6.10%             | (Ribeiro et al., 2011) |
| FRAP - microplate   | N.R              | N.R   | 90–540                    | Trolox       | 0.999 | 4.80%             | 5.60%             | (Jimenez et al., 2008) |
| ORAC - FIA          | 8                | 0.3   | 18–180                    | Trolox       | N.R   | 3.0–3.4%          | < 4.9%            | (Ramos et al., 2016)   |
| DPPH - SIA          | 1                | N.R   | 10–40                     | Caffeic acid | N.R   | N.R               | 3.90%             | (Polásek et al., 2004) |
| CUPRAC - FIA        | 11               | 2.8   | 25 – 300                  | Trolox       | 0.999 | 0.98%             | 2.80%             | (Ribeiro et al., 2011) |
| ABTS - SIA          | 24.7             | –0.03 | 0–235.13                  | Gallie acid  | 0.999 | 6.40%             | N.R               | (Meanha et al., 2015)  |
| ORAC - SIA          | 3.13             | 1.15  | 10–50                     | Trolox       | 0.999 | 2.15              | 2.65              | Proposed method        |

<sup>a</sup> Concentrations expressed in  $\mu\text{mol Trolox L}^{-1}$ . (r) correlation coefficient; (RSD<sub>r</sub>) Relative standard deviation of repeatability; (RSD<sub>e</sub>) relative standard deviation of reproducibility; (LOQ) limit of quantification; (m) slope of linear regression; N.R. not reported.

**Table 4**

Results of antioxidant capacity in different food samples analyzed by the proposed ORAC-SIA method and the microplate conventional method.

| Samples                      | Antioxidant capacity <sup>a</sup> |              |
|------------------------------|-----------------------------------|--------------|
|                              | SIA                               | Microplate   |
| Vanilla extract              | 42.99 ± 4.60                      | 43.49 ± 1.51 |
| Red wine Merlot              | 21.94 ± 0.99                      | 20.23 ± 2.02 |
| Red wine Carmeneré           | 18.84 ± 2.65                      | 17.97 ± 2.85 |
| Coffee extract Honey process | 7.27 ± 0.61                       | 6.98 ± 0.00  |
| Coffee extract Fully washed  | 9.57 ± 0.03                       | 9.59 ± 0.12  |
| Apple nectar and blueberry   | 4.04 ± 0.09                       | 3.94 ± 0.19  |
| Grape nectar                 | 2.45 ± 0.16                       | 2.70 ± 0.24  |
| Blueberry and grape juice    | 2.74 ± 0.25                       | 3.15 ± 0.28  |
| Blueberry nectar             | 1.74 ± 0.03                       | 1.78 ± 0.01  |

<sup>a</sup> Expressed in  $\mu\text{mol Trolox mL}^{-1}$  of sample.

frequency because 60 samples are analyzed at the same time in 90 min, which is the time necessary to carry out the reaction, the proposed SIA method offers an analysis time of 5 min per sample, showing an alternative to determining the antioxidant capacity with similar equivalents to microplate method, reducing costs and time of analysis.

#### CRedit authorship contribution statement

**Willmann Antonio Jiménez-Morales:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – original draft. **María del Pilar Cañizares-Macias:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Formal analysis, Writing – review & editing. **José Pedraza-Chaverri:** ORAC method Supervision, Formal analysis.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

The authors want to thank to the the Dirección General de Apoyo al Personal Académico (Grant No. PAPIIT IT200718) and Facultad de Química from Universidad Nacional Autónoma de México for financial support and to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) throughout the Ph.D. Chemical Sciences program scholarship (No. 620290, CVU 817915).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132524>.

#### References

- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- AOAC International. (2019). *Appendix K: Guideline for Dietary Supplements and Botanicals* (p. 32). <http://www.eoma.aoc.org/app.k.pdf>
- Atala, E., Aspée, A., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2013). Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.007>
- Benzie, I. F. 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. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303–311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)
- Cerdà, V., Estela, J. M., Forteza, R., Cladera, A., Becerra, E., Altimira, P., & Sitjar, P. (1999). Flow techniques in water analysis. *Talanta*, 50(4), 695–705. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00196-4)
- Chevion, S., Roberts, M. A., & Chevion, M. (2000). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6), 860–870. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00178-7)
- FDA. (2019). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products* (3rd ed., p. 23).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology & Medicine*. In *Oxford University Press: Vol. 5 ed.* doi:10.1093 / acprof:oso / 9780198717478.001.0001.
- Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2326–2331. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5633>
- 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>
- Jimenez, D., Giuffrida, F., Vanrobaeys, F., Golay, P. A., Cotting, C., Lardeau, A., & Keely, B. J. (2008). High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3470–3477. <https://doi.org/10.1021/jf703723s>
- Kolev, S. D. M. (2008). Advances in flow injection analysis and related techniques. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 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>
- Lima, M. J. R., Tóth, I. V., & Rangel, A. O. S. S. (2005). A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. *Talanta*, 68(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.058>
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- Magalhães, L. M., Santos, M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2009). Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77(5), 1559–1566. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.034>
- Martins, A. C., Bukman, L., Vargas, A. M. M., Barizao, E. O., Moraes, J. C. G., Visentainer, J. V., & Almeida, V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the

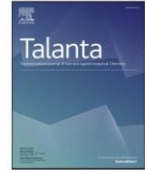
- response surface methodology. *Food Chemistry*, 138(1), 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>
- Meanha, P., Kongkedsuk, J., Hongwitayakorn, A., & Chaisuksant, R. (2015). Antioxidant capacity assays by sequential injection analysis using a peristaltic pump and low-cost amperometric detection with pencil lead electrodes. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 49(6), 895–904.
- Mellado-Ortega, E., Zabalgoeazcoa, 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>
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Miller, N. J., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Technometrics* (Sixth ed.). Pearson Education Limited [www.pearsoned.co.uk](http://www.pearsoned.co.uk).
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.483253>.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Polášek, M., Skála, P., Opletal, L., & Jahodář, L. (2004). Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(5–6), 754–758. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2559-4>
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- Ramos, Inês, I., Gregório, B. J. R., Barreiros, L., Magalhães, Luís, M., Tóth, Ildikó, V., Reis, S., ... Segundo, M. A. (2016). Programmable flow system for automation of oxygen radical absorbance capacity assay using pyrogallol red for estimation of antioxidant reactivity. *Talanta*, 150, 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.061>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Ribeiro, J. P. N., Magalhães, L. M., Reis, S., Lima, J. L. F. C., & Segundo, M. A. (2011). High throughput total cupric ion reducing antioxidant capacity of biological samples determined using flow injection analysis and microplate-based methods. *Analytical Sciences*, 27(5), 483–488. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.483>
- Rojas-López, A., & Cañizares-Macias, 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>
- Ruzicka, J., & Marshall, G. D. (1990). Sequential injection: A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, 237(C), 329–343. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)83937-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83937-9)
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>





Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Fast FRAP-SIA method to determine antioxidant capacity

Willmann Antonio Jiménez-Morales, María del Pilar Cañizares-Macias\*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad de México, C.P. 04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sequential injection analysis  
FRAP  
Antioxidant capacity

### ABSTRACT

One of the most used methods to measure antioxidant capacity in food is the ferric reducing antioxidant power (FRAP) test, which is simple, sensitive, and economical, nevertheless has long analysis times, causing measurement errors due to the instability of the FRAP reagent due to its precipitation sequential injection analysis (SIA) is a flow technique that can correct these disadvantages because it is more quickly. So, a novel FRAP-SIA method was developed to evaluate the antioxidant capacity. The system was optimized using a central composite design for hydrodynamic and chemical factors, resulting in a flow rate of  $35 \mu\text{L s}^{-1}$ , and aspirate volumes of  $33 \mu\text{L}$ – $38 \mu\text{L}$ – $33 \mu\text{L}$  for the sequence (FRAP-Antioxidant-FRAP). FRAP reagent was prepared with an HCl solution at  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ , improving its stability 24 times, concerning when it is in acetate buffer at pH 3.6. The method showed excellent accuracy (RSD <3%) with a LOD of  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  of Trolox for a linear range of  $5$ – $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The reaction time was diminished by 96% concerning the FRAP-microplate assay (from 30 min to 1.2 min). The method was applied in beverages and extracts, obtaining recovery values ranging from 91.24 to 114.22%.

### 1. Introduction

In recent decades, antioxidants have been the subject of critical studies since they can prevent, and balance cell damage caused by oxidative stress. These studies have led to advances in food science, nutrition, and molecular and cellular biology [1–3]. Apak et al., 2016 redefined antioxidants as “natural or synthetic substances that can prevent or delay oxidative cell damage caused by physiological oxidants such as reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and free radicals” [4]. The formation of ROS/RNS can occur in cells through enzymatic reactions such as the superoxide radical anion ( $\text{O}_2^-$ ), which is generated through enzymes such as NADPH oxidase and participates in several reactions that produce hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxyl radical ( $\text{OH}^*$ ), and peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) [5]. ROS/RNS can also be generated from endogenous (immune cell activation, inflammation, mental stress, excessive exercise, ischemia, infections, and cancer) or exogenous (air and water pollution, cigarette smoke, alcohol, heavy metals, certain drugs, industrial solvents, and radiation) sources. The overproduction of ROS/RNS generates a phenomenon called oxidative stress, which can seriously alter cell membranes and other structures such as proteins, lipids, lipoproteins, and deoxyribonucleic acid (DNA), causing pathologies such as cancer, nephropathy, rheumatoid arthritis, cardiovascular, neurological, pulmonary, and ocular diseases [6–9]. Oxidative stress can be counteracted by neutralizing these

ROS/RNS with endogenous (naturally generated in situ) or exogenous (externally supplied through food) antioxidants. Endogenous antioxidants can be found in the body's enzymes or compounds metabolism produces. In contrast, exogenous antioxidants can be found in vitamins such as E and C, carotenoids, and flavonoids consumed through food or supplements [1].

The intake of antioxidants in the diet can help to maintain an adequate antioxidant status and, therefore, the normal physiological function of a living system [10,11]. Although antioxidants are recognized as significant phytonutrients, no “total antioxidant” nutrient index is currently available for food labeling due to a lack of standard quantification methods. Unlike other nutrients, the chemical diversity of antioxidants makes it laborious to separate and quantify individual antioxidants from the plant matrix. Therefore, it is necessary to establish a method to measure the total antioxidant activity directly from food samples. Various methods have been developed to measure total antioxidant activity, total antioxidant capacity, or total antioxidant potential. Among them, representative assays are the ferric reducing antioxidant power (FRAP) test [12,13], the acid 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic) assay (ABTS) [14,15], 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil assay (DPPH) [16,17], and oxygen radical absorption capacity test (ORAC) [18,19]. From a chemical point of view, these methods are based on a single electron transfer reaction (SET) or a hydrogen atom transfer reaction (HAT) between an oxidant and a free radical. For

\* Corresponding author.

E-mail address: [pilarm@unam.mx](mailto:pilarm@unam.mx) (M.P. Cañizares-Macias).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125813>

Received 6 November 2023; Received in revised form 14 February 2024; Accepted 17 February 2024

Available online 28 February 2024

0039-9140/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

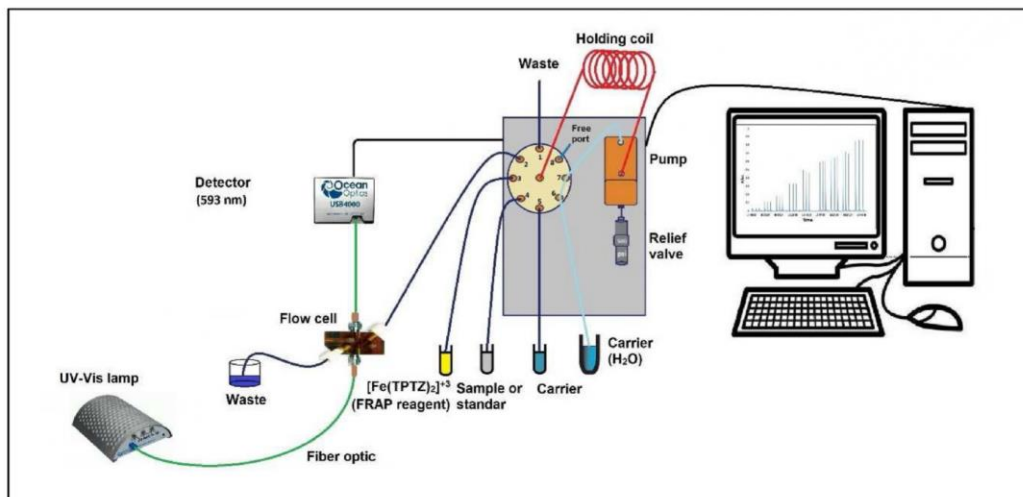


Fig. 1. Schematic representation of the SIA system to quantify the antioxidant capacity by the FRAP method.

SET-based methods like FRAP and ABTS, antioxidants are oxidized by oxidants like Fe (III) or ABTS<sup>•+</sup>, while in a HAT-based method as ORAC, a radical initiator is used to generate peroxy radicals (ROO<sup>•</sup>) [20]. ROO<sup>•</sup> preferentially extracts a hydrogen atom from the antioxidant, and as a result, the reaction between ROO<sup>•</sup> and the target molecule probe is retarded or inhibited. Since these methods are chemically different and based on several reaction mechanisms, it is necessary to evaluate the antioxidant capacity of a sample using varied techniques and thus provide comparable antioxidant values.

Recently, attention has focused on a widely used method, the FRAP assay. This method has characteristics such as low cost and high sensitivity, it is fast and relatively simple to perform, and it has been used to generate a rich database of the total antioxidant content of a wide variety of foods as published in 2014 by Benzie [21]. The method has been used to assess the bioavailability of reducing antioxidants in food matrices and the effect of processing and cooking on the antioxidant content of foods such as soy milk, cocoa, and tea [22]. Also, biological fluid samples such as plasma, serum, urine, or saliva can be analyzed without extraction [23]. Measuring the antioxidant absorption after food intake and beverages, including apples, fruit juices, and teas, is convenient. Foods, herbs, and spices can be extracted by various solvents such as cold water, hot water, methanol, ethanol, acetone, or hexane [24]. The FRAP assay is less susceptible to the effects of solvents than other total antioxidant capacity tests, such as the DPPH and ORAC assays.

Microplate-based FRAP assays were recently introduced by Firuzi et al., in 2005 [25] and ten years later optimized by Bolanos et al. [26], which improved sample throughput compared to manual FRAP assays [27,28]. However, the optical path length for microplate readers is not always the same, and results may be affected by changes in sample volume and composition [29,30]. Most microplate readers need the automatic photometric path length correction feature in more expensive models. The dependence of the optical path length on sample volume leads to the results of the microplates being compared less easily between different laboratories. Applying flow methods to determine antioxidant capacity provides advantages such as time reproducibility and analytical signal, which are significant when measurement involves reactions with kinetic differences [31–35]. Another feature is the computer control that allows adjustable and flexible systems to flow parameters without manifold physical handling [36]. However, implementing flow methodologies to determine antioxidant activity has not been widely exploited; consequently, there is only one report of a FRAP method by flow injection analysis [34].

On the other hand, sequential injection analysis (SIA) is the second generation of flow injection analysis (FIA) techniques based on computer flow programming [37]. Among the advantages of the SIA, the manifold is universal and easy to use, unlike FIA. The SIA manifold fixes the circulation of liquids in different directions, being able to stop the flows at the time that is required. In FIA, the peristaltic pump is usually permanently in motion, performing or not the analytical measurements, leading to inadequate consumption of reagents. However, in SIA, the system only acts when the reactions are required, so reducing the consumption of samples and reagents is drastic concerning the FIA [38].

This work proposes a new FRAP method by SIA to determine the antioxidant capacity of food samples through spectrophotometric detection without delay times stopping the flow and the use of a reactor, with a reduction of sample and reagent volume, and finally with a high precision and sampling frequency. The method was designed based on the FRAP microplate method, and the physicochemical and hydrodynamic parameters were optimized using a central compound experiment design. The data quality involving the linear range, LOD, LOQ, precision, and recoveries were calculated following the validation procedures of international standards. The antioxidant capacity correlation between the SIA method and microplate method, using the trolox standard, was evaluated. Finally, the analysis results of different food samples, such as wines, juices, and species extracts, were compared with those obtained by the standard microplate method to demonstrate the reliability of the proposed method.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents and dissolutions

All reagents used were analytical grade. 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromano-2-carboxylic acid (trolox), iron (III) chloride hexahydrate, dibasic sodium phosphate heptahydrate, and monobasic potassium phosphate were from Sigma-Aldrich. Hydrochloric acid and glacial acetic acid were from J. T. Baker.

The FRAP working solution was prepared by mixing 12.5 vol of a HCl solution (0.005 mol L<sup>-1</sup>) with one volume of TPTZ solution (10 mmol L<sup>-1</sup> dissolved with HCl 40 mmol L<sup>-1</sup>) and one volume of ferric chloride solution (20 mmol L<sup>-1</sup> in water). The FRAP working solution was prepared daily and used at room temperature. A stock trolox solution (400 μmol L<sup>-1</sup>) was prepared in water and stored at 4 °C in darkness. From



**Table 1**  
- Programming of the SIA system to quantify antioxidant capacity by the FRAP.

| Step | Action                             | Port | Description   | Flow rate ( $\mu\text{L s}^{-1}$ ) | Flow direction | Time (s) |
|------|------------------------------------|------|---|------------------------------------|----------------|----------|
| 1    | Filling the pump with the carrier  | 6–7  | The pump is filled with 1500 $\mu\text{L}$ of distilled water.                      | 100                                | Inverse        | 15       |
| 2    | FRAP reagent aspirate              | 3    | 33 $\mu\text{L}$ of FRAP reagent is aspirated into the holding coil.                | 70                                 | Inverse        | 0.47     |
| 3    | Antioxidant aspirate               | 4    | 38 $\mu\text{L}$ of antioxidant is aspirated into the holding coil.                 | 70                                 | Inverse        | 0.54     |
| 4    | FRAP reagent aspirate              | 3    | 33 $\mu\text{L}$ of FRAP reagent is aspirated into the holding coil.                | 70                                 | Inverse        | 0.47     |
| 5    | Carrier aspirate                   | 5    | 110 $\mu\text{L}$ of water is aspirated into the holding coil.                      | 50                                 | Inverse        | 2.2      |
| 6    | Dispensed to detector              | 2    | 100 $\mu\text{L}$ is dispensed to the detector.                                     | 20                                 | Forward        | 5        |
| 7    | Dispensed to detector <sup>a</sup> | 2    | 1614 $\mu\text{L}$ is dispensed from the holding coil and the pump to the detector. | 35                                 | Forward        | 46       |

<sup>a</sup> Detection at 593 nm.

the stock solutions, standard solutions were prepared daily to build the calibration curves.

## 2.2. Samples treatment

The analyzed food samples were cranberry juice, grape juice, cranberry-grape juice, red wines (carmenere and merlot), honey coffee beans, green tea, and tomatoes purchased in local supermarkets in Mexico City. Samples were analyzed using the proposed FRAP-SIA and standard microplate FRAP methods. For coffee and tea extracts, 0.9 g of ground samples were weighed and dissolved with 20 mL of distilled water at 87 °C in magnetic stirring for 5 min. Later, the extract was filtered and collected.

Tomato extracts were obtained by weighing 1 g of dried tomato, adding 20 mL of a 55% ethanol/water solution, and then applied to the ultrasound-assisted irradiation sample at a power of 40%. Five cycles of 10 s of irradiation and 30 s of no-irradiation were performed. After extraction, the extracts were filtered and collected. All samples were diluted in distilled water.

## 2.3. Manifold of the FRAP-SIA method

Fig. 1 shows the schematic representation of the proposed SIA manifold to quantify antioxidant capacity under the FRAP methodology. The reagent and sample solutions were aspirated and driven through an 8-port multiposition valve integrated into FIALab SICrom equipment. The holding coil (PEEK polymer 0.76 mm I.D.) was 1 mL in volume. Teflon tubes (0.76 mm I.D.) were used for interconnections with the SIA equipment (sample, carrier, residues, and exit to the detector). The carrier solution was sucked through a Teflon tubing (3 mm I.D.) to fill the pump reservoir (4 mL).

The reaction was carried out in the holding coil. Optical fibers (400  $\mu\text{m}$  I.D.), a Z flow cell (10 mm optical path), a UV-Vis-NIR light source, and a UV-Vis USB4000 detector of Ocean Optics set at 593 nm constituted the optical detection system. The programming of the sequential

injection was achieved by computerized control of the FIALab SICrom equipment using the FIALab software for Windows version 5.0.

## 2.4. Sequential injection procedure

The FRAP assay's antioxidant capacity is based on a redox reaction between the antioxidant and the complex  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ . Since  $\text{Fe}^{+3}$  reduced to  $\text{Fe}^{+2}$ , it is possible to associate the reaction degree with the antioxidant capacity of the antioxidants being the reaction measured by changing the color of the complex  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  (yellow) to  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+2}$  (blue) at 593 nm, obtaining absorbance values associated with the antioxidant capacity of the sample.

For the FRAP assay, it was necessary to form the complex  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  before using it. So, the complex  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ , called FRAP reagent, was prepared by mixing solutions of HCl 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ , TPTZ 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  (dissolved in HCl 40 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) and  $\text{FeCl}_3$  20 mmol  $\text{L}^{-1}$  in proportion 12.5:1:1. The FRAP reagent was prepared daily before used.

The programming of the FRAP-SIA method is shown in Table 1, where the distilled water carrier (step 1) filled the equipment pump. The FRAP reagent, sample, standard, and carrier solution were sequentially aspirated into the holding coil (steps 2 to 5). Later, 100  $\mu\text{L}$  was dispensed from the holding coil to the UV-Vis detector (step 6); finally, all the volume contained in the holding coil and pump was dispensed to the UV-Vis detector (step 7) set to 593 nm.

### 2.4.1. Measurement of the antioxidant capacity

The antioxidant capacity determined by the FRAP assay consisted of measuring the absorbance of the  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  complex before (Ao) and after (As) reacting with the sample or standard and using the following equation:

$$A_{\text{FRAP}} = A_{\text{S}} - A_{\text{O}} \quad (1)$$

From the  $A_{\text{FRAP}}$  values, a calibration curve was constructed with trolox standards, plotting the trolox concentrations used against the  $A_{\text{FRAP}}$  obtained. The antioxidant capacity values were reported in  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of trolox.

## 2.5. Previous tests to optimize the FRAP-SIA method

As the antioxidant compound for the previous tests and the final optimization, the Trolox reagent was used because it is a water-soluble compound with a structure like vitamin E, which is used in biological or biochemical applications to reduce stress or oxidative damage [39,40]. In addition, units called trolox equivalents, such as  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of trolox, are characteristic of assays such as ABTS, DPPH, ORAC, and FRAP [20].

### 2.5.1. Reaction evaluation in the FRAP-SIA system

The programming is as in Table 1. An antioxidant-FRAP-antioxidant aspiration sequence with aspirate volumes of 25  $\mu\text{L}$ -30  $\mu\text{L}$ -25  $\mu\text{L}$ , respectively, and an output flow to the detector of 20  $\mu\text{L s}^{-1}$  was applied to ensure the reaction between the FRAP reagent and a trolox standard 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and measuring the reaction product at 593 nm. The increasing signal (peak) obtained by increased absorbance indicated that the antioxidant capacity reaction was carried out by FRAP-SIA assay. The FRAP reagent was prepared as proposed by Thaipong et al. [41] by mixing buffer solutions of acetates 0.3 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 4.7), TPTZ 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  and  $\text{FeCl}_3$  20 mmol  $\text{L}^{-1}$  in a ratio of 10:1:1.

**2.5.1.1. FRAP solution stability.** From the first report of the FRAP assay by Benzie in 1996 [13] until recent works where the FRAP assay is used [42], the way of preparing the FRAP reagent has been the same, ignoring that the reagent is unstable for long analysis times, due to it precipitates an hour after its preparation. It is fundamental that the ferric complex ( $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ ) does not precipitate as solid particles because the concentration of the FRAP reagent will be affected, causing a high

**Table 2**  
Combinations of different mixtures to improve the stability of the FRAP solution.

| Experiment | Mixing solutions                                  | Proportion        |                                |          |
|------------|---|-------------------|--------------------------------|----------|
| Mix 1      | Acetate buffer<br>300 mmol L <sup>-1</sup> pH 4.7 | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (20:1:1) |
| Mix 2      | Phosphate buffer<br>300 mol L <sup>-1</sup> pH 2  | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (10:1:1) |
| Mix 3      | HCl 40 mol L <sup>-1</sup> pH 1.4                 | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (10:1:1) |
| Mix 4      | Phosphate buffer<br>300 mol L <sup>-1</sup> pH 2  | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (20:1:1) |
| Mix 5      | HCl 40 mol L <sup>-1</sup> pH 1.4                 | TPTZ <sup>a</sup> | FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup> | (20:1:1) |

<sup>a</sup> TPTZ concentration at 10 mmol L<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> FeCl<sub>3</sub> concentration at 20 mmol L<sup>-1</sup>.

**Table 3**  
- CCD in 3 blocks with three central points to optimize the FRAP-SIA system.

| Factors   | Low level | Central point | High level |
|---|-----------|---------------|------------|
| FRAP reagent concentration (%)                            | 50        | 75            | 100        |
| Aspirated volume in $\mu\text{L}$ (FRAP-Antioxidant-FRAP) | 10-15     | 17.5-22.5     | 25-30-25   |
| Delay time (seconds)                                      | 20        | 40            | 60         |
| Flow rate ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )                        | 20        | 25            | 30         |
| Total experiments   | 33        |               |            |

variability in the antioxidant capacity measurements. For this reason, the stability of the complex  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  was evaluated for 2 h to observe physical changes in the composition. Measurement of antioxidant capacity was also performed by the FRAP-SIA method using trolox 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  with ten repetitions to verify if the antioxidant capacity measurements remained constant (reproducible peaks). So, five new ways to prepare the FRAP reagent were proposed (Table 2). These experiments were monitored in darkness and light, using amber and transparent bottles for storage.

### 2.5.2. FRAP-SIA aspiration sequence

In the SIA system, the reagents and samples are sequentially aspirated, and the chemical reaction will depend on the diffusion of each aspirated zone. It must be adequate to implement the reaction between reagents and antioxidants. Several experiments were carried out varying the aspiration sequences and their respective volumes (see Table S1 of the Supplementary Material) to obtain the highest absorbance using a trolox standard 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . For these experiments, the programming of Table 1 was used, with an output flow rate in the flow cell of 20  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

### 2.6. Reaction optimization

From the improvement to the preparation of the FRAP reagent to increase its stability, experiments to optimize the FRAP-SIA method were made using a central compound experiment design (CCD). The programming sequence used was the one shown in Table 1.

#### 2.6.1. Hydrodynamic and chemical parameters

A CCD to maximize the analytical response of the FRAP-SIA method was built into three blocks and three center points for each block, giving a total of 33 experiments. The factors evaluated were the volume aspirated, the output flow rate to the detector, the delay time, and the concentration of the FRAP reagent, using  $A_{\text{FRAP}}$  as the response variable.

The volume aspirated of the sample and the FRAP reagent following the aspirate sequence, FRAP-Antioxidant-FRAP, was considered a single factor. Therefore, the low and high-volume levels for the sample and standard solutions were 15 and 30  $\mu\text{L}$ , and for the FRAP reagent, 10 and 25  $\mu\text{L}$ , respectively (see Table 3). The concentration of the FRAP reagent was as a percentage, so the FRAP reagent without dilution was considered 100%. Table 3 shows the low, high, and center point values for each

factor of the central composite design. The antioxidant standard was a trolox solution of 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 2.7. Characteristics of the FRAP-SIA method

After establishing the best hydrodynamic and chemical conditions of the FRAP-SIA system through optimization, the method characteristics, such as the linear interval of the calibration curve, limit of detection, limit of quantification, precision, and recoveries, were calculated. All experiments used the trolox standard as an antioxidant, thus reporting results of antioxidant capacity in  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalent trolox.

#### 2.7.1. Calibration curves

A trolox concentration range from 5 to 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  was initially proposed. Later, the calibration curve was plotted from trolox concentrations (x-axis) versus  $A_{\text{FRAP}}$  (y-axis). Five calibration curves were constructed after fixing the linear interval to obtain an average calibration curve. The values of the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) from the mean and standard deviation of the absorbance measurement of 10 replicates of the blank were calculated [43]. The average absorbance of the blank ( $A_B$ ) plus three times the blank standard deviation ( $S_B$ ) for LOD Eq (2) and ten times for LOQ Eq (3) were calculated. Then, the value obtained from the summation was interpolated in the calibration curve of the FRAP-SIA method and expressed in units of  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of trolox for LOD and LOQ [43,44].

$$\text{LOD} = A_B + S_B * 3 \quad (2)$$

$$\text{LOQ} = A_B + S_B * 10 \quad (3)$$

#### 2.7.2. Intermediate precision

The precision of the analytical method, as intra-laboratory reproducibility and repeatability, was evaluated using duplicate solutions of a trolox standard of 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and a sample of red merlot wine at 0.67%. The objective of using a red wine sample was to obtain a better precision estimation when using a complex matrix with more than one antioxidant compound. One-factor analysis of variance (ANOVA) for repeatability and reproducibility was performed [43,45], and the parameters of relative standard deviation (RSD) were calculated (Table S2 of the Supplementary Material).

#### 2.7.3. Analysis of food samples

Red wines, fruit juices of blueberries and grapes, coffee, green tea, and vegetables such as tomatoes have a high antioxidant capacity value and have health benefits thanks to their ingestion [21]. The applicability of the proposed FRAP-SIA method for ten samples of red wines, juices, and coffee and tea extracts was evaluated. The commercial wines and juices were only diluted in distilled water for quantification; coffee and green tea were extracted by maceration, and tomato applied ultrasound energy. The same samples were used for the recovery study by FRAP-SIA and FRAP assay by the microplate method.

#### 2.7.4. FRAP microplate assay

The microplate FRAP method is the improved version of the FRAP standard test since this method substantially reduces the volumes of sample and reagent used, and it allows reading up to 96 samples in a single analysis using a 96-well plate reader. Therefore, this method was the reference method to compare the results obtained by the proposed FRAP-SIA method. A single-channel Biotek Synergy HT microplate reader was used, integrated with a xenon flash lamp, a monochromator, and temperature control. The analysis was computer-controlled using BioTek's Gen5 software. Trolox standard solutions from 5 to 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to build the calibration curve obtaining a slope of  $0.0028 \pm 4 \times 10^{-5}$ , intercept of  $-0.013 \pm 0.0046$ , and LOD and LOQ of 5.42 and 7.40 respectively. The FRAP reagent was prepared from the mixture of solutions of TPTZ (10 mmol L<sup>-1</sup>), FeCl<sub>3</sub> (20 mol L<sup>-1</sup>), and acetate buffer



(0.3 mol L<sup>-1</sup> and pH 3.6) in a ratio of 1:1:10. The analytical procedure of the FRAP test on microplate was carried out according to previous ones with slight modifications [26]. Briefly, in a microplate of 96 wells (costar 3595), 280 µL of the FRAP reagent and 20 µL of the sample or standard were dispensed for each microwell, thus obtaining a total volume of 200 µL. The analysis was at room temperature instead of 37 °C, because no variations were observed in the results, and the measured absorbance was at a wavelength of 593 nm after 30 min. The blanks used distilled water instead of the sample or standard. The A<sub>FRAP</sub> values were calculated using Eq (1), and the antioxidant capacity values were expressed as µmol L<sup>-1</sup> equivalent of the trolox standard.

### 2.7.5. Recovery

The percentage of recovery by FRAP-SIA was measured by the antioxidant capacity in triplicate of the samples diluted in water: merlot and carmeneret red wines (both at 0.25%), grape juices (0.67%), cranberry (0.50%), and grape-blueberry (0.50%), honey coffee extract (0.40%), and extracts of tomato and green tea (0.01% and 0.25%, respectability). The calibration curve was simultaneously prepared as the fortification analysis to obtain better precise and accurate data. After knowing the antioxidant capacity of the samples, the fortified samples were prepared by adding concentrations of trolox standards of 10, 30, and 60 µmol L<sup>-1</sup>.

From the same samples as FRAP-SIA but using other dilutions: merlot and carmeneret red wines at 0.071% and 0.076%, juices of grape at 1.00%, blueberry at 0.29%, grape-blueberry at 0.31%, extract of honey coffee at 0.18%, and extracts of tomato and green tea at 0.063% and 0.10%, the recoveries using the standard method was calculated. Similarly, the fortified samples were prepared by adding concentrations of trolox of 10, 80, and 160 µmol L<sup>-1</sup>, measuring the antioxidant capacity before and after the fortification.

Finally, the recovery percentage was calculated by dividing the difference in antioxidant capacity of the fortified sample and the unfortified sample by the concentration of trolox added and multiplied by 100 Eq (4) [43,45].

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{recovered concentration}}{\text{added concentration}} \times 100 \quad (4)$$

## 3. Results and discussion

### 3.1. Analyses of the FRAP reagent

In this work, the chemical parameters for the preparation of the FRAP reagent were evaluated, and the results were compared with the microplate method using the traditional FRAP reagent.

#### 3.1.1. FRAP test reaction assessment

The reaction of the FRAP reagent and the trolox standard, using the SIA system, was evaluated at 593 nm, which is the wavelength of maximum absorbance FRAP reagent reducing ([Fe(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>+2</sup>). The blank of the reaction was the FRAP reagent without reacting with the trolox standard, giving an absorbance signal lower than 0.05; when the FRAP reagent and trolox reacted between them, the absorbance signal increased at 0.8 units, indicating that the reaction by SIA was possible (Fig. S1 of the supplementary material). From these data, the optimization of this reaction was carried out. The maximum absorption wavelength of the FRAP reagent reduced was 593 nm.

#### 3.1.2. Evaluation of the FRAP solution stability

In 2013, Martins et al. proposed the first FRAP assay adapted to a flow method providing an analysis frequency of 30 samples per hour, using sample/reagent volumes of 91.4 µL, and doubling the FRAP reagent concentration [34]. However, the way of preparing the FRAP reagent ([Fe(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>+3</sup>) was similar to that first reported by Benzie and Strain in 1996 [13], which required mixing acetate buffer (300 mmol

L<sup>-1</sup> and pH 3.6), TPTZ (10 mmol L<sup>-1</sup>), and FeCl<sub>3</sub> (20 mmol L<sup>-1</sup>) in a 10:1:1 ratio, without considering that the formation of the FRAP reagent is instability, precipitating after time of its preparation. In such a way reproducing the preparation of the FRAP reagent according to what was reported by Benzie et al. from 1996 to the present and evaluating its stability to physical changes for 2 h, this reagent formed insoluble solid particles after 40 min of its preparation.

When performing the FRAP assay against a trolox solution of 50 µmol L<sup>-1</sup>, after 55 min of preparing the reagent, the absorbances presented a variation higher than the standard deviations of the repetitions carried out in the first 50 min (readings every 5 min). The concentration of the FRAP reagent changed as the solution formed large amounts of solid particles in suspension, interfering with the reaction. It is possible that the acetates buffered solution (300 mmol L<sup>-1</sup> and pH 3.6) initially reported by Benzie is not acidic enough because the TPTZ needs to dissolve it in an HCl solution of 40 mmol L<sup>-1</sup>, which has an approximate pH of 1.4, and when pH increases at 3.6 a fraction of the TPTZ precipitates. In addition, the acetate buffer is at the limits of its buffer zone since the pH is below one unit of the pKa of acetic acid (4.7), impeding the buffer in the medium. Therefore, the solution pH was evaluated to mix TPTZ and FeCl<sub>3</sub> reagents and avoid forming insoluble solid particles in the FRAP reagent solution.

The suggested pH to mix TPTZ and FeCl<sub>3</sub> was an acetate buffer (pKa 4.7) at 300 mmol L<sup>-1</sup> and pH 4.7, 300 mmol L<sup>-1</sup>, a phosphate buffer (pKa 2.1) at 300 mmol L<sup>-1</sup> and pH 2, and a HCl solution at 40 mmol L<sup>-1</sup> and pH 1.4, mixed in proportions 10:1:1 and 20:1:1, TPTZ, FeCl<sub>3</sub> and pH solutions, respectability.

The experimentation showed that the acetate buffer, even though it was in a viable buffer zone, the pH was not adequate to avoid the precipitation of the FRAP reagent. On the other hand, using phosphate buffer at pH 2, the FRAP reagent also precipitated, which could be caused by the excess FeCl<sub>3</sub> reagent in the medium, which caused the phosphate ions in the buffer to bind iron (III), thus forming fractions of iron (III) phosphate precipitate in the FRAP reagent. Finally, when using HCl at 40 mmol L<sup>-1</sup> (the same concentration to prepare the TPTZ reagent) as the preparation medium for the FRAP reagent, it was observed that the reagent was stable for up to a week without presenting precipitation, showing a substantial improvement. The reagent was stable using HCl 40 at mmol L<sup>-1</sup> when mixed with the FeCl<sub>3</sub> solutions on different ratios. At least HCl concentration was tested at 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 2.3), resulting in a solution stable for 24 h. It is also important to note that the stability of the FRAP reagent does not depend on exposure to light. Finally, it was decided to use a mixture of HCl (5 mmol L<sup>-1</sup>), TPTZ (10 mmol L<sup>-1</sup>), and FeCl<sub>3</sub> (20 mmol L<sup>-1</sup>). In the ratio 10:1:1, the reactions were not carried out at a pH too low.

### 3.2. Optimization of FRAP-SIA

Once the preparation of the FRAP reagent allowed a higher stability for this, the hydrodynamic and chemical parameters were optimized.

#### 3.2.1. Evaluation of the aspiration sequence

After evaluating four aspirate sequences, the sequence FRAP-Antioxidant-FRAP showed the highest absorbance value with less standard deviation (Table S3 of the Supplementary Material shows the data). On the other hand, to aspire twice FRAP at first and at the end of the sequence was better than aspire it once because the antioxidant is between two volumes of FRAP, and the reaction bolus is favored by the dispersion effect, allowing better mixing between the standard and the FRAP solution.

#### 3.2.2. Analysis of the experimental design

The matrix of the central composite design shown in Table S4 of the Supplementary Material gives the results of 33 experiments in 3 blocks with three center points. The Pareto chart of standardized effects of the design showed the positive or negative influence of each factor in the

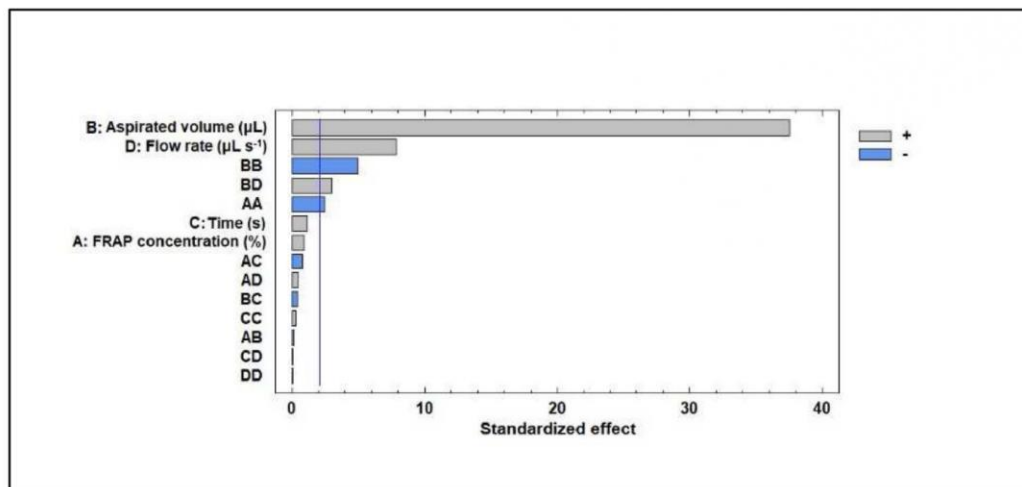


Fig. 2. Standardized Pareto chart with binary interactions of the factors to maximize the response of the FRAP-SIA system.

response variable with a significance level of 95%. Fig. S2 of the Supplementary Material shows the Pareto chart for the main effects. A significant influence on the response variable (absorbance) by the volume of aspirate and the flow rate was observed. The absorbance increases at high values of aspirated volume and output flow rate.

In contrast, the binary interactions of each factor provided a better fit in the design model. Fig. 2 shows the Pareto chart effects with binary interactions. So, it was possible to observe a significant influence on the design by the aspirated volume (BB), the concentration of FRAP (AA), the flow rate (D), and the interaction between the aspirated volume and the flow rate (BD). It is evident that the lower the volume of aspirate and concentration of FRAP, the higher the absorbance. The interaction between volume and flow rate indicated that while these two factors increase simultaneously in the same experiment, absorbance also increases.

The results of the analysis of variance (ANOVA) for each factor without interactions indicated that the aspiration volume and flow rate had a significant influence on the experiment (P-Value <0.05) (Table S5 of the Supplementary Material). On the other hand, the binary interactions showed that the concentration of the FRAP reagent and the

flow rate-volume interaction also influenced the experimentation; this is due to the binary interactions representing a quadratic-type fit for the modeling of the experiment, which ensures a better estimate of the influence of the factors. The  $R^2$  of the mathematical model of the experiment design was 98.960%, indicating a good fit between the experimental absorbance values and those predicted by the regression model.

The experimental design with binary interactions to obtain the values for maximizing the absorbance response was carried out from the influential factors of the FRAP-SIA method. Therefore, for each one, the following optimal values suggested by the central composite design were obtained:  $35 \mu\text{L s}^{-1}$  for flow rate, waiting time of 0 s, 80% FRAP dilution, and aspirate volumes of  $33 \mu\text{L}$ – $38 \mu\text{L}$ – $33 \mu\text{L}$  (FRAP-Antioxidant-FRAP).

### 3.3. Analytical characteristics of the FRAP-SIA proposed method

#### 3.3.1. Linear range, LOD, and LOQ

The linear range obtained using the trolox standard was from 5 to  $160 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Fig. S3 of the Supplementary Material). A better estimate of

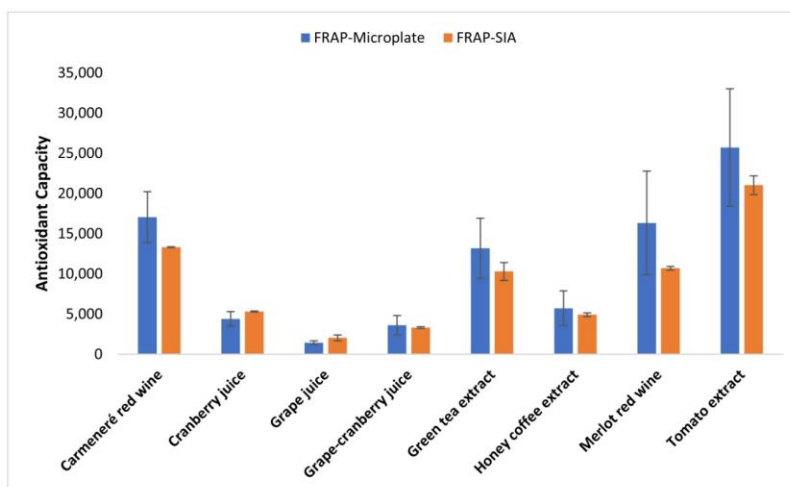


Fig. 3. Comparative graph of antioxidant capacity values analyzed by FRAP-SIA and FRAP-Microplate.



**Table 4**  
Comparison of the characteristics between the proposed FRAP-SIA method with different published methods to determine the antioxidant capacity.

| Method            | LOQ <sup>a</sup> | m      | Linear range <sup>b</sup> | Standard         | r     | %RSD <sub>r</sub> | %RSD <sub>re</sub> | Ref.            |
|-------------------|------------------|--------|---------------------------|------------------|-------|-------------------|--------------------|-----------------|
| ORAC - microplate | 5                | 1.5    | 6.25–50                   | Trolox           | 0.999 | <15               | <15                | [19]            |
| DPPH - microplate | N.R.             | 0.15   | 50–500                    | Trolox           | 0.999 | 1.1–8.3           | 1.3–2.1            | [48]            |
| FRAP - microplate | 90               | N.R.   | 90–540                    | Trolox           | 0.999 | 4.8 and 4.9       | 5.6 and 17.3       | [28]            |
| FRAP - microplate | 26.1             | 0.94   | 250–2000                  | Ferric sulphate  | 0.975 | 2.7–6.7           | 5.3–10.1           | [49]            |
| ORAC - SIA        | 3.13             | 1.15   | 10–50                     | Trolox           | 0.999 | 2.2               | 2.7                | [50]            |
| DPPH - SIA        | 1                | N.R.   | 10–40                     | Caffeic acid     | N.R.  | N.R.              | 3.9                | [35]            |
| ABTS - SIA        | 24.7             | −0.03  | 0–235.13                  | Gallic acid      | 0.999 | 6.4               | N.R.               | [44]            |
| FRAP - FIA        | 86.8             | N.R.   | 100–500                   | Ferrous sulphate | >0.99 | 1.3               | N.R.               | [34]            |
| FRAP - SIA        | 1.0              | 0.0064 | 5–120                     | Trolox           | 0.999 | 1.5 and 1.6       | 1.6 and 2.0        | Proposed method |

(r) correlation coefficient; (RSD<sub>r</sub>) Relative standard deviation of repeatability; (RSD<sub>re</sub>) relative standard deviation of reproducibility; (LOQ) limit of quantification; (m) slope of linear regression; N.R. not reported.

<sup>a</sup> Concentrations expressed in  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of standard.

the calibration curves between one day and another was using data from 5 calibration curves constructed daily to construct an average curve (Fig. S4 of the Supplementary Material). The ANOVA of the average curve (Table S6 of the Supplementary Material) showed a directly proportional relationship (P-value <0.05) between the response (absorbance) and the trolox concentration with a significance level of 95%. In addition, the residuals (the difference between the observed absorbance values and those predicted by the regression line) were analyzed through the residue graph (Fig. S5 of the Supplementary Material) as a function of the concentration of the trolox standard. This graph presented a random distribution without any tendency to vary the concentration of trolox. In this way, it was possible to assert that the data of the curves fit the linear regression model type 1, resulting in a homoscedastic variance. The linear regression equation of the average curve had a slope of  $0.0064 \pm 9.4 \times 10^{-5}$ , an intersection of  $0.0049 \pm 0.0064$ , and a correlation coefficient of 0.9998 with a 95% confidence interval. The LOD and LOQ values were  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $1.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively.

### 3.3.2. Intermediate precision

A trolox solution ( $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and a red wine merlot sample at 0.67% (v/v) were used to evaluate the precision of the FRAP-SIA (data in Table S7 of the Supplementary Material).

The sum of squares (SS), the degrees of freedom (Df), and the mean square (MS) of the variation of the antioxidant capacities of each sample between days and within days were calculated using an ANOVA (data in Table S8 of the Supplementary Material). The repeatability values obtained on the same day (within days), and the interlaboratory reproducibility or intermediate precision in several days (between days) expressed as relative standard deviations were 1.51% and 2.07% for Merlot wine, as well as 1.56% and 1.64% for the trolox standard, respectively.

The results showed that the precision as reproducibility improves a little when the trolox standard solution is used, but the difference is insignificant. Repeatability and reproducibility were less than 3%, which denotes that the FRAP-SIA method presents good precision according to the criteria of the AOAC and the CODEX Alimentarius [46, 47].

### 3.4. Analysis of food samples

The antioxidant capacity values from the analyzed samples by the FRAP-SIA and FRAP-microplate methods were expressed in trolox  $\mu\text{mol L}^{-1}$  equivalent. Fig. 3 shows the graph with the results of antioxidant capacity in samples. The microplate method used the original FRAP reagent under the standard method at pH 3.4 and noticed a high standard deviation in all samples. These results also show that the stability of the FRAP reagent is essential to obtain suitable and precise results. The standard deviations on the proposed method are very low, influencing several factors such as the stability of the FRAP reagent, principally,

reaction time shorts, same detection time because the way the sample and reagents from the injection and detector are always the same, so, there is no difference of analysis time between a sample and another, as with the microplate method happens.

When an analytical method is new, comparing the results with a currently tested and applied analytical method is imperative. Consequently, through the data obtained by both methods, it is feasible to infer that the results differ. However, when considering the high standard deviation provided by the microplate method, it is impossible to significantly distinguish between them since the maximum or minimum error of the FRAP-microplate method is found in the mean values of the FRAP-SIA method.

Table 4 presents a comparative analysis of regression values and precision among various methods (FIA, SIA, and microplate) as reported in the literature for antioxidant capacity determination. Notably, the data obtained through the proposed FRAP-SIA method exhibits superior precision, encompassing both repeatability and reproducibility, when compared to the microplate FRAP method.

Although the FRAP assay is one of the most cited assays for determining total antioxidant capacity, universal calibration parameters have not been calculated for quality control. For example, the dependence of the optical path length on the sample volume leads to results from microplate assays lacking in inter-laboratory precision. Bolanos de la Torre et al., in 2015 demonstrated that when verifying that microplate readers decrease the sensitivity of colorimetric analysis compared to data from a 1 cm pathlength spectrophotometer [26]. There is also little information regarding the validation of the FRAP-microplate assay. Ustundag et al., 2016, the first to report the complete validation parameters [49], described that even though the FRAP-microplate assay reduces consumption in the volume of reagents and sample and increases the sampling rate. It is also too poor concerning the precision and accuracy of the method, reporting a coefficient of variation (CV) of up to 18.5% and recoveries with a trend below 100%, which indicates a clear systematic error. These high CV values of the FRAP-microplate assay are mainly attributed to analyst error when dispensing small volumes (10–200  $\mu\text{L}$ ) of sample and reagents into the microplate wells, as it is very complex. Other assays to determine antioxidant capacity, such as ORAC per microplate, have also been affected in reproducibility [51] because the antioxidant inhibition reaction does not start simultaneously in all 96 wells due to technical limitations when dosing the antioxidant and radical. For this reason, the proposed FRAP-SIA method is a better alternative to determine the antioxidant capacity in food samples, unlike the microplate method, which has pronounced variability in the antioxidant capacity results.

### 3.5. Recovery

The matrix effect and accuracy of the FRAP-SIA method were evaluated through the recoveries of 8 samples fortified with concentrations of trolox at  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The trolox concentrations chosen for the



**Table 5**

The recovery obtained percentages by the FRAP-SIA and FRAP-microplate methods.

| Samples               | %Recovery by FRAP-SIA <sup>a</sup> | %Recovery by FRAP-microplate <sup>b</sup> |
|-----------------------|------------------------------------|---|
| Merlot red wine       | 114.22                             | 97.92                                     |
| Carmeneret red wine   | 94.66                              | 99.47                                     |
| Grape juice           | 100.80                             | 91.17                                     |
| Cranberry juice       | 108.31                             | 89.73                                     |
| Grape-cranberry juice | 108.99                             | 90.51                                     |
| Honey coffee extract  | 104.22                             | 91.50                                     |
| Green tea extract     | 94.88                              | 91.50                                     |
| Tomato Extract        | 107.85                             | 90.29                                     |

<sup>a</sup> Samples fortified with 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  trolox.

<sup>b</sup> samples fortified with 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  trolox.

fortifications were in the middle of the calibration curve. In the case of determining the % recovery for the FRAP method by microplate, the trolox concentration was 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  based on the criteria described above. The recovery percentages obtained for both methods are in Table 5. The recoveries ranges were from 94.66% to 114.22% and from 89.73% to 99.47% for the FRAP method by SIA and microplate, respectively. Comparing the recovery values by both FRAP methods is fundamental to note that the FRAP-SIA method has values random between 94.66 and 114%, and the FRAP method by microplate a distribution that tends to recovery values always less than 100%, which indicates a possible error attributed to the method and not to the samples analyzed.

#### 4. Conclusions

It was identified that the FRAP reagent was unstable after 50 min of its preparation, forming insoluble particles. No papers have reported this problem with the reagent, and it has been used in the FRAP methods by microplate being one of the consequences, among others, for the reproducibility of this method. The stability of the FRAP reagent improved by decreasing the medium pH and replacing the acetate buffer with HCl, which allowed the use of the FRAP reagent for long periods of up to 24 h without presenting precipitation. The FRAP-SIA method is the first FRAP method by flow that offers advantages such as a sampling rate of 50 samples per hour, a total volume of 104  $\mu\text{L}$  of sample and reagent, a reduction of FRAP reagent concentration of 30%, not requiring a reactor and without reaction times stopping the flow. In this way, each of the characteristics exceeded that reported by Martins et al., in 2013 when proposing a FRAP method by FIA with a sampling rate of 30 samples per hour, volumes of 91.4  $\mu\text{L}$  for both sample and reagent, increased doubled the concentration of the FRAP reagent, and finally required the use of a reactor for the reaction to take place.

Furthermore, the SIA method presented a substantial improvement in measurement errors. This barrier has not yet been overcome in microplate methods ( $\text{CV} > 18\%$ ), thus highlighting the proposed FRAP-SIA method with high precision ( $\text{RSD} < 3\%$ ). Finally, even though the sampling rate of the FRAP method per microplate is 96 samples per 30 min, the use of the 96 wells will depend on the needs of each analyst since the analysis time will be the same for one sample or 96. In this way, the FRAP-SIA method is an alternative, offering an analysis time of 1.2 min per sample with high precision.

#### CRedit authorship contribution statement

**Willmann Antonio Jiménez-Morales:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft. **María del Pilar Cañizares-Macias:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgements

The authors want to thank to the Dirección General de Apoyo al Personal Académico (Grant No. PAPIIT IN211521) and Facultad de Química from Universidad Nacional Autónoma de México (5000–9029) for financial support and to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) throughout the Ph.D. Chemical Sciences program scholarship (No. 620290, CVU 817915). We also want to thank Finca Las Nieves, San Juan Lachao, Oaxaca, Mexico, for donating the honey coffee samples.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125813>.

#### References

- [1] A.Z. Renata Micha, *Antioxidants in Health and Disease*, Firts, Taylor Francis Group, 2015.
- [2] R. Banerjee, A.K. Verma, M.W. Siddiqui, *Natural Antioxidants. Applications in Foods of Animal Origin*, Firts, Taylor & Francis Group, 2017.
- [3] B. Halliwell, J.M. C Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Fifth, 2015.
- [4] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu, Antioxidant activity/capacity measurement. I. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 997–1027, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.
- [5] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem.* 266 (2004) 37–56.
- [6] M. Trevisan, R. Browne, M. Ram, P. Muti, J. Freudenheim, A.M. Carosella, D. Armstrong, Correlates of markers of oxidative status in the general population, *Am. J. Epidemiol.* 154 (2001). <https://academic.oup.com/aje/article/154/4/348/62001>.
- [7] M.A. Smith, C.A. Rottkamp, A. Nunomura, A.K. Raina, G. Perry, Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1502 (2000) 139–144. [www.elsevier.com/locate/bba](http://www.elsevier.com/locate/bba).
- [8] I. Guidi, D. Galimberti, S. Lonati, C. Novembrino, F. Bamonti, M. Tiritico, C. Fenoglio, E. Venturelli, P. Baron, N. Bresolin, E. Scarpini, Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 262–269, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.01.001>.
- [9] J.L. Bolton, M.A. Trush, T.M. Penning, G. Dryhurst, T.J. Monks, Role of quinones in toxicology, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 135–160, <https://doi.org/10.1021/tx9902082>.
- [10] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- [11] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review, *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 55–74, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- [12] I.F.F. Benzie, Y.T. Szeto, Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 633–636, <https://doi.org/10.1021/jf9807768>.
- [13] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": the FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76.
- [14] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407.
- [15] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [16] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 28 (1995) 25–30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [17] G. Bobo-García, G. Davidov-Pardo, C. Arroqui, P. Virseda, M.R. Marin-Arroyo, M. Navarro, Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic

- content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods, *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 204–209, <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>.
- [18] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R.L. Prior, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4619–4626, <https://doi.org/10.1051/jp2:1995126>.
- [19] D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, R.L. Prior, 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, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4437–4444, <https://doi.org/10.1021/jf0201529>.
- [20] A.M. Pisoschi, G.P. Negulescu, Methods for total antioxidant activity determination: a review, *Biochem. Anal. Biochem.* 1 (2012) 1–10, <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>.
- [21] I.F.F. Benzie, S.W. Choi, Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs, in: *Adv Food Nutr Res*, Academic Press Inc., 2014, pp. 1–53, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8>.
- [22] S. Wachtel-Galor, K.W. Wong, I.F.F. Benzie, The effect of cooking on Brassica vegetables, *Food Chem.* 110 (2008) 706–710, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.056>.
- [23] G. Bartosz, Total antioxidant capacity, *Adv. Clin. Chem.* 37 (2003) 219–292.
- [24] J. Pérez-Jiménez, F. Saura-Calixto, Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Res. Int.* 39 (2006) 791–800, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.003>.
- [25] O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, L. Saso, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1721 (2005) 174–184, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001>.
- [26] A.A.S. Bolanos De La Torre, T. Henderson, P.S. Nigam, R.K. Owusu-Apenten, A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey, *Food Chem.* 174 (2015) 119–123, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.009>.
- [27] R. Tsao, R. Yang, J.C. Young, Antioxidant isoflavones in osage orange, *maclura pomifera* (raf.) schneid, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6445–6451, <https://doi.org/10.1021/jf0342369>.
- [28] D. Jiménez-Alvarez, F. Giuffrida, F. Vanrobaeys, P.A. Golay, C. Cotting, A. Lardeau, B.J. Keely, High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3470–3477, <https://doi.org/10.1021/jf703723s>.
- [29] A.D. Smith, V.C. Morris, O.A. Levander, Rapid Determination of Glutathione Peroxidase and Thioredoxin Reductase Activities Using a 96-well Microplate Format: Comparison to Standard Cuvette-Based Assays, 2001.
- [30] J. Lampinen, M. Raitio, A. Perälä, H. Oranen, R.-R. Harinen, Microplate Based Pathlength Correction Method for Photometric DNA Quantifi Cation Assay, 2012.
- [31] S. Kurbanoglu, M.A. Unal, S.A. Ozkan, Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds, *Electrochim. Acta* 287 (2018) 135–148, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.217>.
- [32] M.J.R. Lima, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity, in: *Talanta*, Elsevier, 2005, pp. 207–213, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.058>.
- [33] L.M. Magalhães, M. Santos, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity, *Talanta* 77 (2009) 1559–1566, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.034>.
- [34] A.C. Martins, L. Bukman, A.M.M. Vargas, É.O. Barizão, J.C.G. Moraes, J. V. Visentainer, V.C. Almeida, The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: optimising the conditions using the response surface methodology, *Food Chem.* 138 (2013) 574–580, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>.
- [35] M. Polásek, P. Skála, L. Opletal, L. Jahodár, Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 754–758, <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2559-4>.
- [36] S.D. Kolev, I.D. Mckelvie, *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, First, Elsevier, 2008. [www.elsevier.com/locate/permissions](http://www.elsevier.com/locate/permissions).
- [37] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Sequential Injection : a New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays*, 1990.
- [38] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, Flow techniques in water analysis, *Talanta* 50 (1999) 695–705. [www.elsevier.com/locate/Talanta](http://www.elsevier.com/locate/Talanta).
- [39] V.F. Sagach, M. Scrosati, J. Fielding, G. Rossoni, C. Galli, F. Visioli, The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E, *Pharmacol. Res.* 45 (2002) 435–439, <https://doi.org/10.1006/plrs.2002.0993>.
- [40] U. Singh, S. Devaraj, I. Jialal, Vitamin E, oxidative stress, and inflammation, *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 151–174, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446>.
- [41] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, D. Hawkins Byrne, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 669–675, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.
- [42] J. Rumpf, R. Burger, M. Schulze, Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins, *Int. J. Biol. Macromol.* 233 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>.
- [43] J.N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, sixth ed., Pearson Education Limited, England, 2010. [www.pearsoned.co.uk](http://www.pearsoned.co.uk).
- [44] P. Meanha, J. Kongkedstuk, A. Hongwitayakorn, R. Chaisuksant, Antioxidant capacity assays by sequential injection analysis using a peristaltic pump and low-cost amperometric detection with pencil lead electrodes, *Kasetsart Journal - Natural Science* 49 (2015) 895–904.
- [45] Eurolab España, P.P. Morillas Bravo, B. Magnusson, U. Örnemark, *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*, 2016. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org). (Accessed 14 May 2022).
- [46] Aoac International, K. Appendix, *Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*, 2019.
- [47] FAO/WHO, Codex Alimentarius Commission : *Procedural Manual*, twenty-first ed., 2013.
- [48] T.J. Herald, P. Gadgil, M. Tilley, High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour, *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 2326–2331, <https://doi.org/10.1002/jsfa.5633>.
- [49] Y. Ustundag, K. Huysal, S. Kahvecioglu, H. Demirci, S. Yavuz, M. Sambel, D. Unal, Establishing reference values and evaluation of an in-house ferric reducing antioxidant power (FRAP) colorimetric assay in microplates, *The European Research Journal* 0 (2016), <https://doi.org/10.18621/eurj.2016.5000190265>.
- [50] W.A. Jiménez-Morales, M. del P. Cañizares-Macias, J. Pedraza-Chaverri, Fast ORAC-SIA method for antioxidant capacity determination in food samples, *Food Chem.* 384 (2022) 132524, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132524>.
- [51] E. Mellado-Ortega, I. Zabalgozeazcoa, B.R. Vázquez de Aldana, J.B. Arellano, Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay, *Anal. Biochem.* 519 (2017) 27–29, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.009>.