

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**Correlación de la capacidad antioxidante total entre  
suero, saliva y orina empleando las técnicas de ABTS y  
FRAP en personas saludables**

**TESIS**

Para optar el título profesional de Licenciada en Tecnología Médica  
en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

**AUTORA**

Sonia Victoria Ochante Tejada

**ASESORA**

Silvia Suárez Cunza

**Lima – Perú**

**2015**

La presente tesis fue realizada en el CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE  
BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN “ALBERTO GUZMÁN BARRÓN” DE LA FACULTAD  
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesora, la Dra. Silvia Suárez Cunza, gran persona y maestra a quien admiro desde la primera clase que me brindó, gracias por su tiempo y paciencia. A los licenciados del laboratorio clínico INEN por su increíble y desinteresada ayuda. A los participantes en general, sin ellos imposible el desarrollo de este trabajo. A Tamin y Joel, por ser más que amigos, ser como mis hermanos y cuidarme tanto durante mi vida universitaria.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Hugo y Sonia, por su increíble e infinito amor, por la fe y confianza que siempre depositaron en mí. A mis hermanas, Yessica y Milagros, mis dos motores y luces de mi vida. A mis abuelos y familia en general, a quienes les debo todo.

## ÍNDICE

|  |         |
|--|---------|
| Resumen.....   | 1 - 2   |
| I. Introducción.....   | 3 - 5   |
| II. Antecedentes.....  | 6       |
| III. Importancia de la Investigación.....                      | 7       |
| IV. Objetivos.....   | 8       |
| V. Referencia de la literatura pertinente de trabajo realizado |         |
| V.1. Base teórica.....   | 9 - 14  |
| V.2. Hipótesis.....  | 14      |
| VI. Métodos  |         |
| VI.1. Tipo de Investigación.....                               | 15      |
| VI.2. Diseño.....  | 15      |
| VI.3. Población.....   | 15      |
| VI.4. Muestra.....   | 15 - 16 |
| VI.5 Variables.....  | 16      |
| VI.6. Técnicas e Instrumentos.....                             | 16 - 17 |
| VI.7 Procedimientos y análisis de datos.....                   | 18 - 19 |
| VI.8. Consideraciones éticas.....                              | 19      |
| VII. Resultados .....  | 20 - 24 |
| VIII. Discusión.....   | 25 - 28 |
| IX. Conclusiones y recomendaciones                             |         |
| IX.1. Conclusiones.....  | 29      |
| IX.2. Recomendaciones.....                                     | 29      |
| X. Referencias bibliográficas.....                             | 30 - 32 |
| XI. Anexos.....  | 33 - 41 |

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La evaluación de la capacidad antioxidante total (CAT) constituye un indicador más del estado de salud. La muestra de elección es suero o plasma, su obtención es invasiva, la complejidad varía de acuerdo al tipo de paciente. Alternativamente pueden emplearse otros fluidos de obtención no invasiva como la saliva y la orina. Se requiere validar la correlación de la CAT entre estos tres tipos de fluidos. **OBJETIVO:** Establecer la correlación de la CAT entre muestras de suero, saliva y orina empleando las técnicas de ABTS<sup>+</sup> y FRAP en personas saludables. **DISEÑO:** Observacional-analítico. **LUGAR:** Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina, UNMSM, Perú. **PARTICIPANTES:** Veintitrés personas voluntarias aportaron muestras de suero, saliva y orina. **INTERVENCIONES:** Las muestras se almacenaron a -20°C. Se emplearon las técnicas de ABTS<sup>+</sup> y de FRAP. Se obtuvo el consentimiento informado y se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina-UNMSM. **RESULTADOS:** Con la técnica de ABTS<sup>+</sup>, la correlación de Pearson para suero-saliva fue -0,315; suero-orina, 0,165 y saliva-orina, -0,150. Con la técnica del FRAP, el coeficiente de correlación de Pearson entre suero-saliva fue -0,015, suero-orina 0,206, y saliva-orina -0,086. **CONCLUSIÓN:** No existe correlación significativa entre estos tres tipos de muestras. Sin embargo, se observa que la correlación entre suero-saliva por ABTS.+ y suero-orina por FRAP son no despreciables y es probable que aumente con mayor número de voluntarios. La muestra con mayor CAT es la orina, y la de menor CAT, la saliva.

**Palabras claves:** Capacidad antioxidante total, flebotomía, ABTS<sup>+</sup>, FRAP

**ABSTRACT:** Evaluation of total antioxidant capacity (TAC) is another indicator of health status. The specimen of choice is serum or plasma, their collection is invasive, complexity varies according to the kind of patient. Alternatively other non-invasively obtaining fluids as saliva and urine may be used. It is necessary to validate the correlation of TAC between these three types of fluids. **OBJECTIVE:** To establish the correlation between the TAC serum, saliva and urine using the ABTS<sup>+</sup> and FRAP techniques in health people. **DESIGN:** Observational-analytic. **SETTING:** Biochemistry and Nutrition Research. Faculty of Medicine, UNMSM, Peru. **PARTICIPANTS:** Twenty three volunteers provided samples of serum, saliva and urine. **INTERVENTIONS:** The samples were stored at -20°C. ABTS<sup>+</sup> and FRAP techniques were used. It was informed and was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine - San Marcos. The consent was obtained. **RESULTS:** By the ABTS<sup>+</sup> technique, the Pearson correlation to serum-saliva was -0,315; serum-urine, 0,165 and saliva-urine, -0,150. By FRAP technique, the Pearson correlation to serum-saliva was -0,015; serum-urine, 0,206 and saliva-urine -0,086. **CONCLUSION:** There is not significant correlation between these three types of samples. However, we can mention that the correlation between serum-saliva by ABTS<sup>+</sup> and serum-urine by FRAP are not negligible and is likely to increase with more volunteers. The sample with greatest TAC is the urine, and the lowest TAC, the saliva.

**Keywords:** Total Antioxidant Capacity (TAC), phlebotomy, ABTS<sup>+</sup>, FRAP

## I. INTRODUCCIÓN

La capacidad antioxidante<sup>1</sup> es un sistema de defensa biológica contra los radicales libres (RL) y otras especies reactivas, con el fin de impedir su formación y por otro lado, neutralizarlos una vez formado.

Se define químicamente a los RL como todas aquellas especies químicas cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo y que cuando son estructuras de bajo peso molecular les da una configuración espacial de gran inestabilidad, haciéndolos muy reactivos<sup>2</sup>.

Los RL centrados en el oxígeno también son conocidos como Especies Reactivas del Oxígeno (EROS), incluyen a moléculas no radicales libres. Los RL son de vida corta por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran principalmente la cadena respiratoria mitocondrial, el sistema de detoxificación a nivel microsomal, entre otros; es decir, los EROS son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula, y es que estas cumplen funciones fisiológicas en el organismo<sup>3</sup> como la de participar en la fagocitosis, favorecer a la síntesis de colágeno y la síntesis de prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis.

Sin embargo, al tener electrones desapareados o estructuras inestables, colisionan con diversas biomoléculas y logran sustraerle o donarle un electrón, produciendo una reacción Redox univalente provocando la formación de productos que pueden haber perdido o alterado su función específica en la célula.

Cuando esta acción de daño "tóxico" supera la capacidad de defensa antioxidante se le conoce como estrés oxidativo, así por ejemplo si la molécula oxidada son los lípidos, se dañarán las estructuras ricas en ellas como la membrana celular, alterando la permeabilidad conduciendo al edema y probablemente muerte celular, igualmente en el caso de las lipoproteínas,



dándose el caso de la oxidación de la LDL, lipoproteína relacionada con la génesis de la placa ateromatosa.

Para el caso de ser una proteína, las consecuencias de esta son la formación del entrecruzamiento de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos, y el impedimento del normal desarrollo de sus funciones. Otra molécula que puede ser dañada por los RL es el ADN, esta acción en los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o en la pérdida de expresión por daño al gen específico.

Es por todo ello que el mantener niveles adecuados de radicales libres (los suficientes para que realicen su papel fisiológico pero no en exceso para ocasionar continuamente estrés oxidativo) es importante para poder retardar el envejecimiento o evitar a largo plazo daños en el organismo y con ello diferentes enfermedades o sus complicaciones.

El sistema de defensa antioxidante, evaluada a nivel sérico o plasmático como la capacidad antioxidante, viene a cumplir su papel, ya que este sistema de defensa podrá controlar el exceso de los radicales mediante<sup>1</sup>:

- La presencia de macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción.
- La presencia de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa.
- La presencia de antioxidantes endógenos como glutatión, ácido úrico, entre otros, y antioxidantes exógenos como la vitamina E.
- El sistema de reparación, que son sistemas que tratan de recuperar la función de las moléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular.

Lo expresado justifica la evaluación de la capacidad antioxidante total (CAT) en el laboratorio clínico. Puede observarse en la literatura internacional diversas pruebas de laboratorio que son aplicadas, cada vez con mayor frecuencia, con este fin y se ha llegado a encontrar relación entre desbalances de la capacidad antioxidante con diferentes patologías<sup>4,5,6</sup>, entre ella las cardiovasculares.

La muestra elegida para realizar los diferentes ensayos bioquímicos es por lo general el suero, y para la obtención de esta es necesaria la realización de la flebotomía (toma de sangre venosa), proceso que si bien es de uso común, hay casos en donde la condición del paciente (obesos, niños, entre otros) no permite una adecuada toma de muestra y conlleva a tener ciertas complicaciones, por lo que será de beneficio contar con otros tipos de muestra que sean menos invasivas y de mayor facilidad de obtención, como los son la saliva y la orina.

Es así que el presente estudio tiene como objetivo establecer la correlación de la capacidad antioxidante total entre tres tipos de muestras (suero, saliva y orina) empleando dos técnicas que evalúan esta capacidad *ex vivo* (ABTS<sup>•+</sup> y FRAP), con la finalidad de poder encontrar muestras alternativas de mayor facilidad de obtención y no tener que recurrir exclusivamente a la muestra sanguínea, sobre todo en casos cuya toma sanguínea sea complicada y tediosa.

Asimismo los resultados del presente trabajo contribuyen con valores de un parámetro bioquímico para cada una de las muestras en cada una de las técnicas de laboratorio de aplicación creciente.

## II. ANTECEDENTES

En el presente trabajo se tiene como objetivo evaluar la correlación de la capacidad antioxidante total (CAT) entre suero, saliva y orina mediante dos técnicas de laboratorio. Si bien no se ha encontrado estudios similares, lo que si se halla son diferentes trabajos en donde se determina la CAT en los fluidos biológicos mencionados usando además las mismas técnicas que se aplican para la realización del presente estudio.

Así tenemos investigaciones como el realizado por Cao G, et al (1998, Norteamérica)<sup>7</sup> donde se determina que para su grupo control el CAT en suero aplicando la técnica de ABTS<sup>+</sup> tiene un valor de 1,3 TEAC mmol/L y por la técnica de FRAP, un valor de medio de 388  $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub>/L. Otro estudio es el de Servia, et al (2014, España)<sup>8</sup> donde con la finalidad de poder comparar el CAT en personas saludables con la de pacientes críticos politraumatizados, se determinó que en el primer grupo el CAT en suero usando la técnica de ABTS<sup>+</sup> es de  $2,3 \pm 0,5$  TEAC mmol/L. Fernández – Pachón, et al (2005, España)<sup>9</sup>, aplica en una de sus investigaciones la técnica de FRAP en el suero para estudiar el incremento de este por el consumo de vino rojo, es así que nos indica que el CAT base del suero (antes del consumo del vino) es de  $398 \pm 101$   $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub>/L.

Para el caso de la determinación del CAT en saliva, se encuentra estudios como la de N. Kamodyova, et al (2013, Eslovaquia)<sup>10</sup> donde se analiza el CAT de este fluido mediante las técnicas de ABTS<sup>+</sup> y FRAP, obteniendo para la primera un rango de 0,4 a 1,1 TEAC mmol/L, y para la segunda un rango de 60 a 250  $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub>/L.

Finalmente para la orina, se encontró un estudio realizado por Campos et al (2009)<sup>11</sup> que determina el CAT en este tipo de muestra mediante la técnica de ABTS<sup>+</sup>. En este se reporta un valor referencial de  $4,5 \pm 1,3$  mmol/L.

### **III. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

En años recientes, la literatura<sup>4,5,6</sup> y la práctica clínica muestran la relación que tiene el estado antioxidante plasmático o sérico en una persona con diversas enfermedades y sus complicaciones. El suero es el fluido biológico predilecto para su determinación; sin embargo, en algunos tipos de pacientes, no es fácil ni cómoda la obtención de la muestra de sangre por punción venosa por ser ésta una técnica invasiva.

Esta investigación se realizará porque existen otros dos tipos de fluidos biológicos (saliva y orina) que por su composición y funciones es probable que reflejen el mismo estado antioxidante total. Estos tienen la ventaja de no ser invasivos, de fácil obtención y más económicos. Los resultados del presente proyecto servirían para obtener un parámetro bioquímico de laboratorio de aplicación creciente, sin causar incomodidad para el paciente, con facilidad para el tecnólogo y de utilidad para el médico, y así tener un resultado auxiliar en su historia clínica sin tener que recurrir única y necesariamente a la toma de sangre, siendo además especialmente valioso en los casos de complicado acceso venoso.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo general**

- Establecer la correlación de la capacidad antioxidante total entre muestras de suero, saliva y orina empleando las técnicas de ABTS<sup>+</sup> y FRAP

### **IV.2. Objetivos específicos**

- Determinar la capacidad antioxidante total en muestras de suero, saliva y orina mediante la técnica de ABTS<sup>+</sup>.
- Determinar la capacidad antioxidante total en muestras de suero, saliva y orina mediante la técnica de FRAP.
- Correlacionar la capacidad antioxidante total entre muestras de suero, saliva y orina determinadas por la técnica de ABTS<sup>+</sup>.
- Correlacionar la capacidad antioxidante total entre muestras de suero, saliva y orina determinadas por la técnica de FRAP.

### **IV.3. Finalidad del estudio o investigación**

Poder encontrar muestras alternativas al suero para la evaluación de la capacidad antioxidante total en la persona, como lo son la saliva y orina, ya que estas son de mayor facilidad de obtención y traer como consecuencia de ello, el no tener que recurrir de manera exclusiva a la muestra sanguínea, sobre todo en casos cuya toma de sangre sea complicada y tediosa.

## V. REFERENCIA DE LA LITERATURA PERTINENTE DE TRABAJO REALIZADO

### V.1. Base teórica

#### *V.1.1. Radicales libres, estrés oxidativo y capacidad antioxidante*

Los radicales libres son definidos químicamente como todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo y que cuando son estructuras de bajo peso molecular les da una configuración espacial de gran inestabilidad, haciéndolos muy reactivos. Son de vida media corta por lo actúan cercano al sitio en que se forman<sup>2</sup>.

Se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran principalmente la cadena respiratoria mitocondrial (convirtiendo a la mitocondria en la fuente principal), la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal, entre otros; es decir, los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula.

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de agentes prooxidantes y son llamadas las especies reactivas del oxígeno (EROS), siendo las principales el radical hidroxilo (HO)<sup>•</sup>, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el oxígeno nítrico (NO), peróxido (ROO), semiquinona (Q), ozono.

Los radicales libres del oxígeno tienen funciones fisiológicas en el organismo<sup>3</sup> como la de participar en la fagocitosis, favorecer a la síntesis de colágeno y la síntesis de prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis.

Sin embargo, al ser algunos de ellos compuestos de gran inestabilidad, estas además pueden (y de hecho lo hacen) colisionar con diversas biomoléculas y sustraerle un electrón, oxidándola, y haciendo de esta manera que pierda o altere el cumplimiento de su función específica en la célula. A esta acción de

daño “tóxico” se la conoce como estrés oxidativo, así por ejemplo tenemos que si la molécula oxidada son los lípidos (ácidos grasos polinsaturados), se dañarán las estructuras ricas en ellas como la membrana celular y las lipoproteínas.

En las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en la segunda, la oxidación de la LDL, génesis de la placa ateromatosa. La característica de la oxidación lipídica por los radicales libres es que se trata de una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica, el cual genera numerosos subproductos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo.

Para el caso en el que la molécula atacada sea la proteína, esta trae como consecuencia el entrecruzamiento de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos, e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.). Otra molécula que es dañada es el ADN; esta acción en los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o en la pérdida de expresión por daño al gen específico.

Para mantener un equilibrio y evitar un desborde del daño oxidativo, nuestro cuerpo cuenta con sistemas de defensa biológica contra los radicales libres (RL), que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, lo neutralicen una vez formados; a esto se le conoce como capacidad antioxidante<sup>1</sup> y puede cumplir su función en el organismo mediante: la presencia de macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción, presencia de enzimas antioxidantes (como la superóxido dismutasa), antioxidantes endógenos (glutación, ácido úrico), antioxidantes exógenos (vitamina E, entre otros) y mediante el sistema de reparación, que son sistemas que tratan de recuperar la

función de las macromoléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular.

Mantener un equilibrio prooxidante-antioxidante es entonces un requisito esencial para preservar una buena salud, sin embargo esto no siempre se da ya que son diversos los factores<sup>12</sup> que causan un aumento de la cantidad de radicales libres presentes en el organismo, ya sea por deficiencia de antioxidantes, la cual es causado principalmente por una mala alimentación (dieta deficiente en antioxidantes) o ya sea, y es los más común, por factores que incrementan sustancialmente la producción de radicales libres como por ejemplo factores químicos (aumento de metales pesados, xenobióticos, drogas), factores físicos (radiaciones ultravioleta, hiperoxia), factores orgánicos y metabólicos (dietas hipercalóricas, diabetes), procesos inflamatorios y traumatismos, y ejercicios extenuantes<sup>13</sup>, así también algunos estados emocionales.

Un desbalance entre la producción de EROS y la defensa antioxidante, a favor de los primeros, provocan un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, el cual lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocasionan el deterioro y muerte celular, por lo que hoy en día existen ensayos bioquímicos que sirven como indicadores para evaluar la capacidad antioxidante total de la persona e investigar la relación que pueda existir en diversas patologías.

#### *V.1.2 Sangre y Suero*

La sangre es un tejido conjuntivo especializado, el cual trasporta una serie de sustancias y elementos formes desde un conjunto de células a otro a través de una extensa red de vasos que constituyen parte del aparato circulatorio<sup>14</sup>.

Este tejido está constituido por una parte celular, el cual a la vez se subdivide en eritrocitos, leucocitos y plaquetas; y por otro lado, una porción "líquida", denominada suero o plasma según haya o no ocurrido el proceso de coagulación. Es así, que si la sangre ha pasado un proceso de coagulación previo a su separación mediante centrifugación, al líquido resultante se le denominará suero, pero en caso no se haya coagulado, se le denominará plasma. De manera que la única diferencia esencial en lo que a composición



se refiere entre el plasma y suero es que el primero contiene los factores de coagulación que no se encuentran en el suero<sup>15</sup> y por consiguiente, la composición restante en ambos es prácticamente igual.

Dicha composición es en gran mayoría agua, pero además están los electrolitos, proteínas, nutrientes (glucosa, lípidos, globulinas...), sustancias nitrogenadas no proteicas (úrea, creatinina,...), sustancias reguladoras (hormonas, vitaminas,...), entre otras.

Como vemos, todas ellas son en general sustancias que forman parte y resultado de nuestro metabolismo, siendo esta una de las razones principales por el que suero sanguíneo es el tipo de muestra más usada para la determinación de diferentes analitos, pues es una muestra muy representativa del sistema en un momento dado, y para el caso de la realización de ensayos Redox o pruebas que evalúan la capacidad antioxidante total de la persona no ocurre una excepción, ya que son diversos los estudios que usan como muestra biológica al suero<sup>7,16</sup>.

### *V.1.3 Saliva*

La saliva es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores en 93% de su volumen y menores en el 7% restante, las cuales se extienden por todas las regiones de la boca excepto en la encía y en la porción anterior del paladar duro. Es estéril cuando sale de las glándulas salivales, pero deja de serlo inmediatamente cuando se mezcla con el fluido cervical, restos de alimentos, microorganismos, células descamadas de la mucosa oral, entre otros<sup>17</sup>.

El 99% de la saliva es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas como electrolitos, enzimas, inmunoglobulinas, sustancias tampones simples, inhibidores enzimáticos, factores de crecimiento, citoquinas, productos metabólicos residuales y una variedad de sustancias orgánicas endógenas y exógenas. Estos componentes pueden originarse en las glándulas salivales o ser transferidos a la saliva desde el plasma<sup>18</sup>.

La composición de la saliva es semejante a la del plasma, dependiendo en parte de su velocidad de secreción. Cuanto mayor es esta velocidad, más se asemejan tanto en osmolaridad como en composición<sup>18</sup>.

Es por todo lo mencionado que actualmente la saliva es usada como un buen indicador no invasivo de los niveles plasmáticos de diversas sustancias tales como hormonas y drogas<sup>19</sup>, así como medicamentos.

Asimismo, hoy en día ya es usado en algunos de los ensayos que evalúan el estado oxidativo salival (estado Redox) en personas con diferentes cuadros de patologías odontológicas<sup>20, 21</sup>, ya que la saliva cumple un importantísimo papel en la mantenimiento de la salud vocal<sup>17</sup>.

#### *V.1.4. Orina*

Se le denomina como orina al líquido que se forma en los riñones y es excretado fuera del cuerpo a través de los uréteres, la vejiga y la uretra<sup>15</sup>. Sus principales funciones son la eliminación de los productos finales del metabolismo nitrogenado y el mantenimiento del equilibrio hidroelectrico. Los procesos básicos involucrados en la formación de la orina son la filtración, la resorción y la secreción.

El volumen y composición de la orina puede verse afectado por la dieta (por ejemplo, la ingesta excesiva o insuficiente de agua y sales), por el efecto de los procesos fisiológicos (por ejemplo, al actividad física), por efectos de enfermedades que afectan primariamente al riñón o secundariamente por una condición que se origina en otra parte (por ejemplo, la acción de toxinas bacterianas en el glomérulo).

Actualmente se lo utiliza como muestra en algunos tipos de pruebas bioquímicas, como en la determinación de creatinina, proteínas, entre otros. Sin embargo, no tiene muchas referencias ni aplicaciones en lo que ensayos oxidativos se refiere.

### *V.1.5 Aparente estado de buena salud*

Para este estudio definiremos estado de buena salud como aquella condición en la que el participante no haya sentido ni signos ni síntomas de algún padecimiento de su organismo durante las últimas semanas. Asimismo que no tenga alguna enfermedad crónica.

### **V.2. Hipótesis**

La correlación entre la capacidad antioxidante total hallada en suero con la capacidad antioxidante total determinados en muestras de saliva y orina es positiva.

## VI. MÉTODOS

### VI.1. Tipo de investigación

Cuantitativo no experimental

### VI.2. Diseño

Observacional-analítico

### VI.3. Población

Participantes voluntarios mayores de edad entre 22 y 58 años en aparente estado de buena salud

### VI.4. Muestra

El tipo de muestreo utilizado es no probabilístico, tipo sujetos voluntarios. Al realizar los cálculos para el número de muestra para detectar en los resultados una diferencia que sea estadísticamente significativa en la asociación de 2 variables cuantitativas (r Pearson), se usó la siguiente fórmula:

$$n = \left( \frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3$$

En donde la magnitud de la correlación con la que se deseó detectar (r) fue de 0,6; la seguridad con la que se trabajó (1- $\alpha$ ) fue de un 95% ( $\alpha=0,05$ ) y donde el poder estadístico (1- $\beta$ ) fue del 80%, o equivalentemente un  $\beta=0,2$ .

Con todo ello se obtuvo el número de muestra de 20 personas. Sin embargo, obtuvo 23 personas voluntarias.

#### Criterios de Inclusión

- Personas en aparente estado de buena salud de ambos sexos
- Edad mayor de 18 años

- Aceptar y firmar el consentimiento informado

#### Criterios de Exclusión

- Tomar algún medicamento diurético
- Ser sintomático respiratorio
- Padecer de inflamación a las encías
- No haber cumplido con alguna de las indicaciones dadas para la recolección de cada uno de los tipos de muestras.

#### VI.5. Variables

- Marcadores de la capacidad antioxidante total en muestras de suero
- Marcadores de la capacidad antioxidante total en muestras de saliva
- Marcadores de la capacidad antioxidante total en muestras de orina

#### VI.6. Técnicas e instrumentos

##### *Técnicas*

Fundamento de la técnica del ABTS<sup>•+</sup><sup>22</sup>:

Técnica bioquímica en el que se usa como reactivo base al radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>, generado a partir de la activación de su precursor, el Ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS), por el agregado del persulfato de potasio.

Este radical de color verde-azulado, estable, se decolora al ser reducido por el poder reductor de la capacidad antioxidante presente en la muestra biológica. Es así que la capacidad antioxidante se evalúa por la decoloración medida en absorbancia (734nm) en el espectrofotómetro. La disminución de absorbancia deberá de ser desde un 20% a un 80%.

La actividad de la muestra se expresará como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity: mmol de Trolox/ L de muestra problema). Se empleó la técnica de Re y col, 1999

Fundamento de la técnica de FRAP<sup>22</sup>:

Método que permite evaluar de forma total el potencial reductor atribuible a las especies antioxidantes presentes en suero o plasma<sup>23</sup> y otros fluidos biológicos.

Está basado en la determinación de la concentración final de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  (ferrosos), formados por la reducción de iones  $\text{Fe}^{3+}$  (férricos), utilizando TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) como cromógeno, por lo que se evidencia un aumento de absorbancia. La linealidad de la intensidad que se obtiene es hasta lecturas de alrededor 0,7 de absorbancia, y es por ello que se procederá a realizar diluciones si la lectura excede a este valor.

La actividad de la muestra se expresará como AEAC (Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity: mmol de ácido ascórbico/ L de muestra problema). Se procedió con el ensayo según Benzie y Strain; 1996.

#### *Instrumentos*

- Frascos de vidrios de borosilicato (Pyrex<sup>R</sup>)
- Criobiales de 2mL
- Centrífuga Kossodo PLC series R
- Pipetas transferpette Brand R
- Espectrofotómetro Greetmed NV 203 R
- Congeladora Bosh modelo Intelligent Freezer 32

#### *Reactivos*

Los reactivos usados fueron de grado analítico adquiridos de la casa Sigma Chemical (USA) y de la casa Merck (Alemania).

Para todos los casos se empleó agua bidestilada.

## **VI.7. Plan de procedimientos**

### *Procedimiento para la obtención de muestras*

A todos los 23 participantes con una edad media de 32 años, se les informó previamente, de una manera sencilla, en qué consistiría el presente trabajo de investigación (tesis) (Anexo 1) así como en lo que se basaría su participación en este.

Asistieron el día programado a las 8 a.m. en ayunas al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) para la toma de muestra sanguínea mediante el uso del sistema al vacío (6mL), trayendo además la muestra orina (la primera de la mañana) y una muestra de saliva espontánea (previo enjuague de boca solo con agua) en los depósitos que se les dio con anterioridad y siguiendo las indicaciones que también se les especificó. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado (Anexo 3) así como también llenaron una encuesta (Anexo 4) que ayudó a reafirmar la consideración de la misma como persona saludable. Al finalizar la jornada se les brindó desayuno como agradecimiento.

De las muestras obtenidas de saliva y orina, se separó una parte en crioviales (2 mL) para su conservación a -20°C hasta el momento de su análisis. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero obtenido de cada uno fue conservado de la misma manera en crioviales.

### *Procedimiento para determinar la capacidad antioxidante total mediante ABTS<sup>+</sup>*

Para el desarrollo de la técnica del ABTS<sup>+</sup>, primero se preparó el reactivo base activando el ABTS con persulfato de potasio y dejándolo reposar unas dieciséis horas antes de su utilización. Como la disminución de absorbancia debe de ser desde un 20% a un 80%, se estandarizó que las diluciones con agua bidestilada para cada uno de los tipos de muestras sería de la siguiente manera: para el suero una dilución de 1/10, para la saliva una dilución de 1/2 y para la orina una dilución de 1/15. Solo hubieron dos excepciones para el caso de dos muestras de orina cuyo poder reductor en esta técnica era tal que salía del rango a pesar de la dilución hecha, por lo que se diluyó adicionalmente 1/2, teniendo como dilución final 1/30.

Antes de empezar la reacción se llevó el reactivo base a una lectura de  $0,7 \pm 0,02$  de absorbancia a 734 nm. Para ello se diluyó el ABTS<sup>+</sup> puro con agua bidestilada hasta llegar a la lectura mencionada. Fue importante mantener el reactivo en oscuridad. Luego de ello, se procede al desarrollo de la técnica que consistió en agregar 50  $\mu$ L de la muestra problema al tubo de reacción con 950  $\mu$ L del reactivo ABTS<sup>+</sup>. De ahí, se incubó por 10 minutos en oscuridad. Para cada corrida se usó un blanco reactivo (cuya absorbancia al momento de leerlo debe de ser de  $0,7 \pm 0,02$ ) y un control o referencia, siendo en este estudio el TROLOX a una concentración de 250  $\mu$ g/mL el utilizado con tal fin.

Procedimiento para determinar la capacidad antioxidante total mediante FRAP

En el caso de la técnica del FRAP, como la linealidad de lectura es hasta 0,7 de absorbancia, se estandarizó que las muestras de suero tengan una dilución de  $\frac{1}{2}$ , y para las de orina, una dilución de  $\frac{1}{3}$ , ambas con agua bidestilada. Caso diferente fue para las muestras de saliva ya que no se les tuvo que realizar dilución alguna. La técnica consistió en agregar 50  $\mu$ L de muestra problema con 950  $\mu$ L de reactivo. Dejar como tiempo de incubación 10 minutos y luego pasar a sus lecturas a una absorbancia de 593 nm. Para cada corrida hubo un blanco y un control. Este último fue hecho con Ácido Ascórbico a una concentración de 0,2 mM.

### **VI.8. Análisis de datos**

Se aplicó estadística descriptiva para los resultados de los análisis de laboratorio: promedio, desviación estándar y rango.

Para el análisis inferencial se aplicó la correlación de Pearson a los resultados de los ensayos de ABTS<sup>+</sup> y FRAP en suero, saliva y orina. Se utilizó el paquete estadístico de Excel 2013 y el de SPSS 13,0.

### **VI.9. Consideraciones éticas**

Por ser un estudio en población humana se sometió a la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNMSM (Anexo 2), además de la aprobación de cada paciente mediante un Consentimiento Informado (Anexo 3).



## VII. RESULTADOS

El grupo estudiado comprendió a 23 personas en aparente estado de buena salud, de edad entre 22 y 58 años (teniendo como media 31 años) y de los cuales el 70% pertenecen al género femenino y el 30% al masculino.

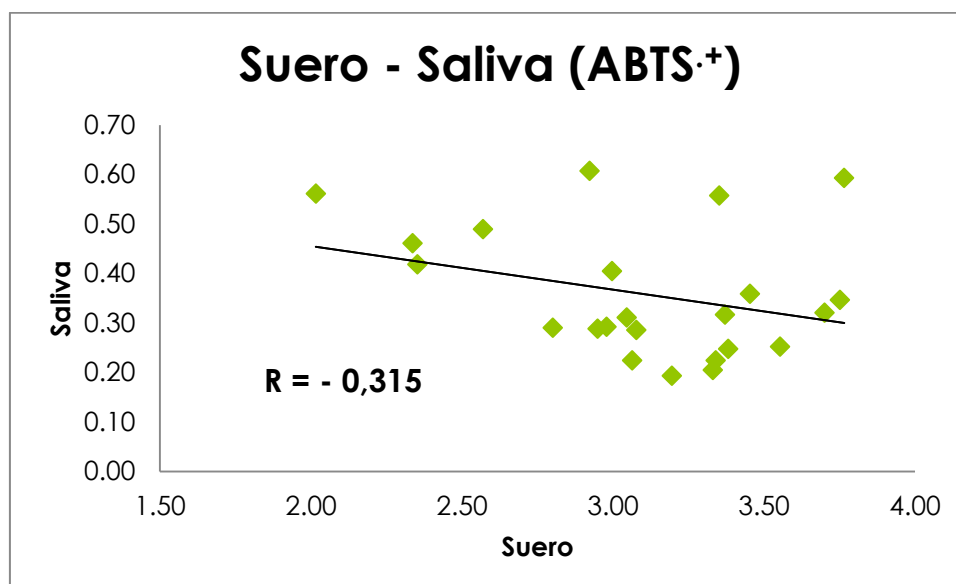
Las muestras de suero y saliva fueron 23 para todos los ensayos, pero la obtención de una de las muestras de orina no se realizó de manera adecuada (participante no siguió las indicaciones dadas), razón por la cual no ha sido considerada para el análisis estadístico de los resultados del procesamiento de las orinas, es decir se contó solo con 22 muestras.

En los resultados de CAT de la muestra de estudio (tabla 1), se observa que para ambas técnicas, la media de CAT de la muestra de saliva es la menor y la de la muestra de orina, la mayor.

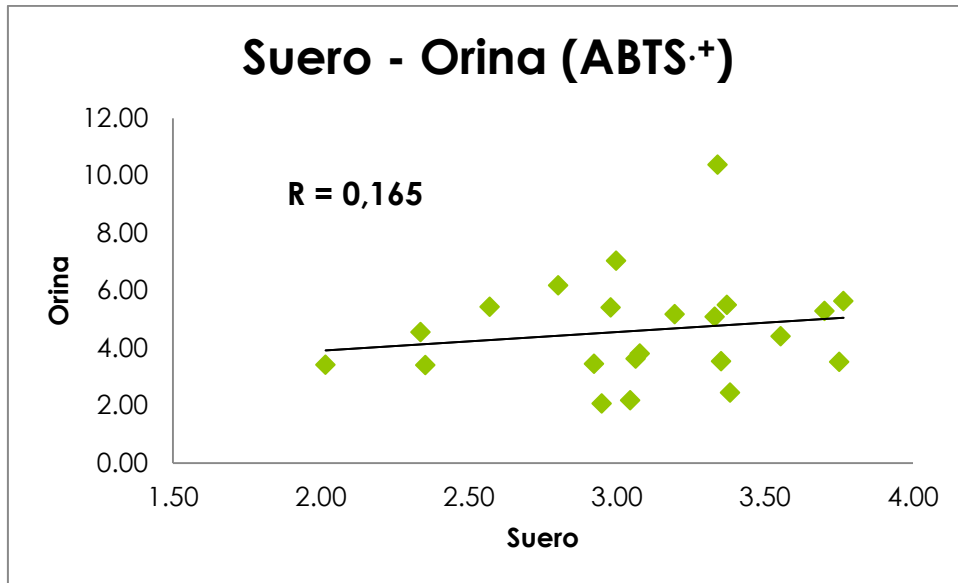
**Tabla 1.** Medias, desviaciones estándar y rangos obtenidos de las muestras trabajadas, según tipo y técnica.

|        | Técnica ABTS <sup>+</sup> |      |              | Técnica FRAP |      |             |              |        |                |
|--------|---------------------------|------|--------------|--------------|------|-------------|--------------|--------|----------------|
|        | TEAC mmol/L               |      |              | AAEAC mmol/L |      |             | FeSO4 μmol/L |        |                |
|        | Media                     | DS   | Rango        | Media        | DS   | Rango       | Media        | DS     | Rango          |
| Suero  | 3,1                       | 0,46 | 2,02 – 3,77  | 0,19         | 0,05 | 0,11 – 0,28 | 317,82       | 66,37  | 196 – 452,4    |
| Saliva | 0,36                      | 0,13 | 0,19 – 0,61  | 0,04         | 0,02 | 0,01 – 0,08 | 79,34        | 40,87  | 20 – 146,2     |
| Orina  | 4,61                      | 1,84 | 2,06 – 10,38 | 0,63         | 0,14 | 0,39 – 0,86 | 1011,75      | 258,21 | 373,1 – 1341,3 |

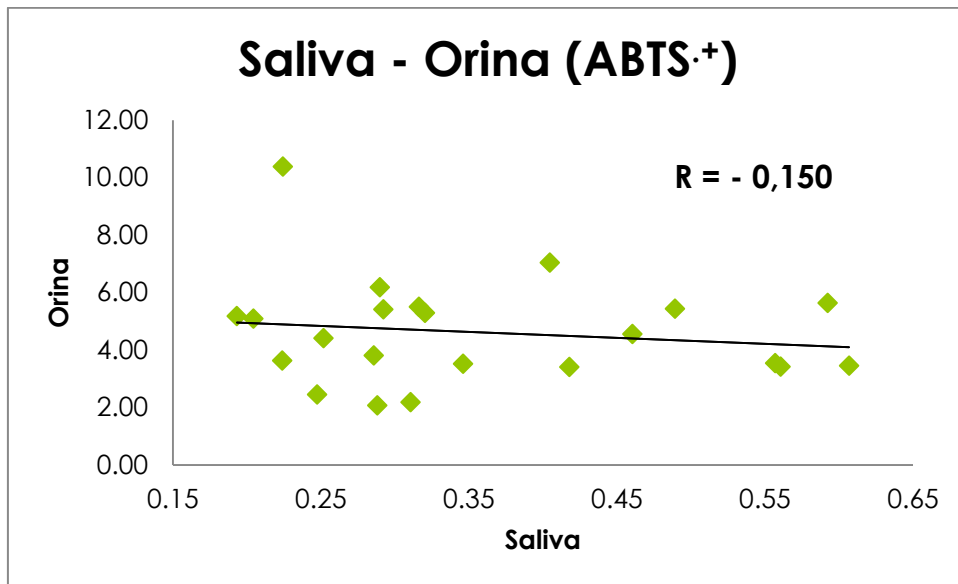
Determinada la capacidad antioxidante total en las muestras de suero, saliva y orina mediante la técnica de ABTS<sup>+</sup> (Anexo 5), se determinó que de las tres correlaciones calculadas (Gráfica 1, Gráfica 2 y Gráfica 3), la mayor correlación se presenta entre suero-saliva, teniendo además un valor  $p < 0,073$ , significancia no despreciable que podría mejorar con el incremento del número de muestras. (Anexo 7).



**Gráfico 1.** Coeficiente de correlación de Pearson de la capacidad antioxidante total determinada por ABTS<sup>+</sup> entre suero y saliva

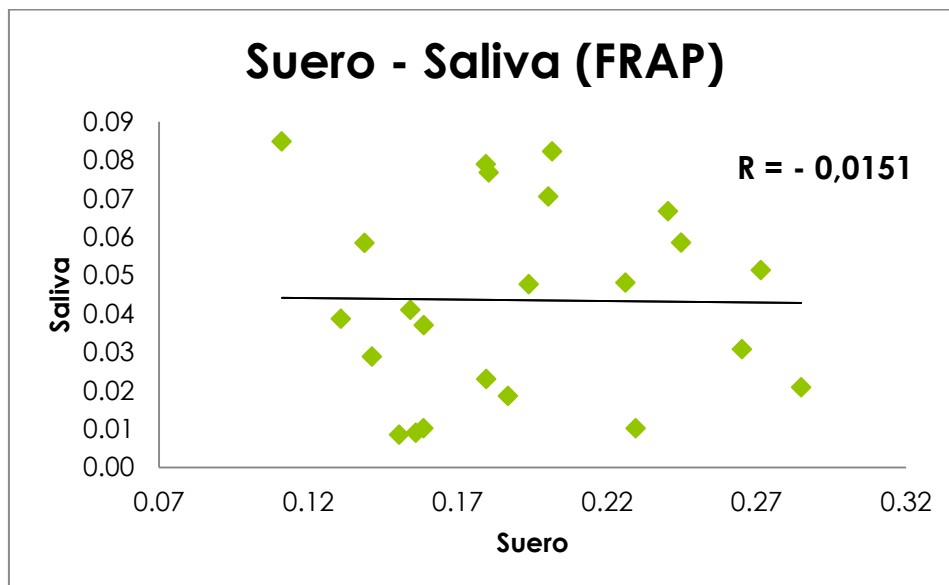


**Gráfico 2.** Coeficiente de correlación de Pearson de la capacidad antioxidante total determinada por ABTS·<sup>+</sup> entre suero y orina

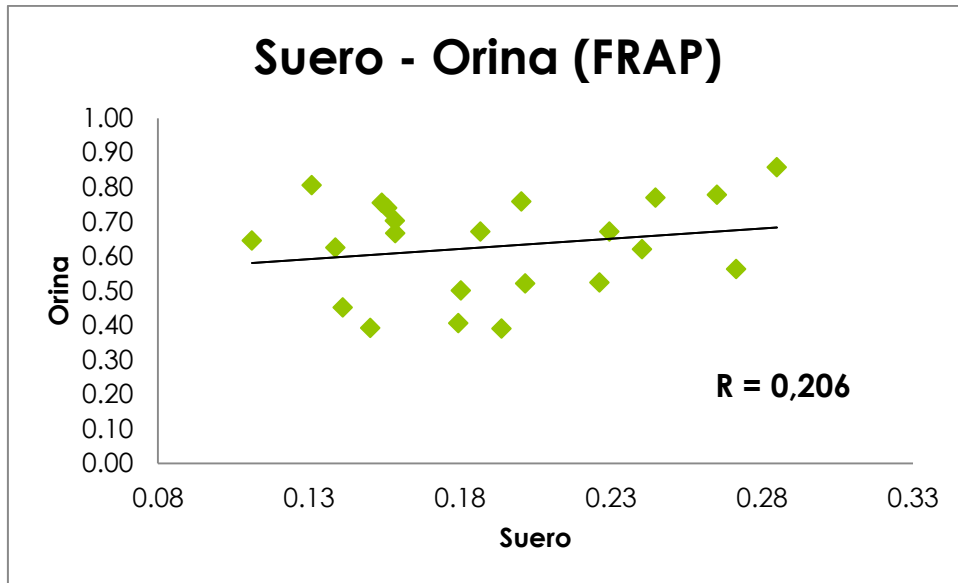


**Gráfico 3.** Coeficiente de correlación de Pearson de la capacidad antioxidante total determinada por ABTS·<sup>+</sup> entre saliva y orina.

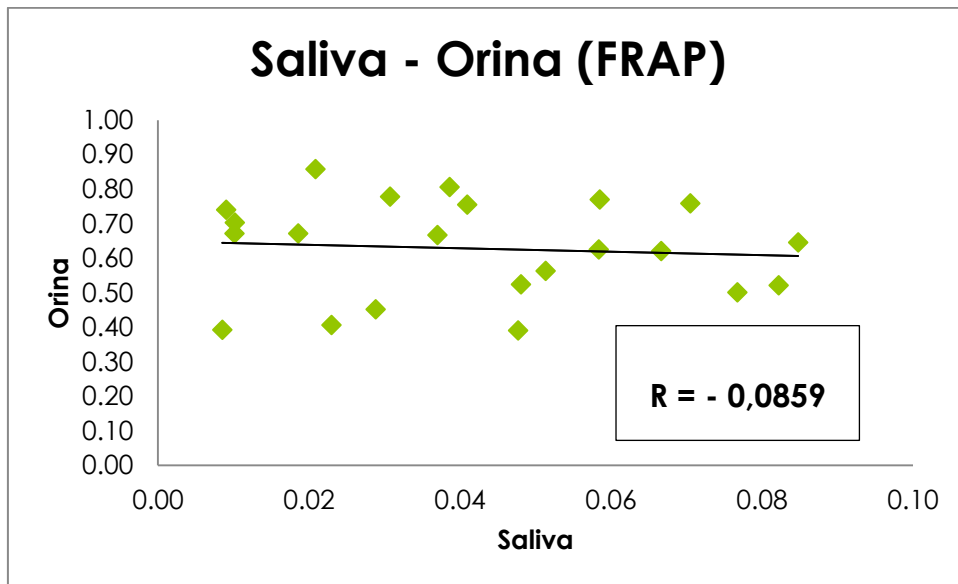
Con los valores de capacidad antioxidante total determinadas en las muestras de suero, saliva y orina mediante la técnica de FRAP (Anexo 6), se calculó las tres correlaciones (Gráfica 4, gráfica 5 y gráfica 6), obteniendo que la mayor correlación se da entre suero-orina, la cual tiene además un grado de significancia no despreciable de 0,181 (Anexo 7)



**Gráfico 4.** Coeficiente de correlación de Pearson de la capacidad antioxidante total determinada por FRAP entre suero y saliva



**Gráfico 5.** Coeficiente de correlación de Pearson de la capacidad antioxidante total determinada por FRAP entre suero y orina



**Gráfico 6.** Coeficiente de correlación de Pearson de la capacidad antioxidante total determinada por FRAP entre saliva y orina

## VIII. DISCUSIÓN

La evaluación de la capacidad antioxidante total, como parte del sistema oxidativo en la persona se ha hecho cada vez más importante en el laboratorio clínico. La muestra elegida para realizar los ensayos es generalmente el suero, sin embargo hay casos en donde dependiendo de las características del paciente (obeso, niño, anciano) esta toma puede ser complicada, entonces la saliva y la orina, cuya obtención es más sencilla y menos invasiva, podrían ser muestras alternativas a cuales recurrir para esta evaluación. Para ello se realizó ensayos que puedan evaluar si existe o no correlación de CAT entre estos.

Así los resultados en cada uno de las tres clases de fluidos biológicos para cada técnica aplicada han mostrado resultados que a continuación se discuten.

Mediante la técnica de ABTS<sup>•+</sup> se obtuvo para el suero, una CAT que va desde 2,02 a 3,77 (con una media de  $3,1 \pm 0,46$ ) expresado en TEAC mmol/L (Tabla 1). Comparándolo a valores encontrados en otros estudios que también aplican la técnica de ABTS<sup>•+</sup>, como el realizado en USA por Cao, et al (1998)<sup>7</sup> en donde para una muestra de personas sanas de edad media de 67 años se obtuvo un valor de 1,3 TEAC mmol/L, y en España, el estudio de Serviá, et al. (2014)<sup>8</sup> donde los valores de CAT para personas de 42 a 58 años fueron desde  $2,3 \pm 0,5$  TEAC mmol/L, los valores que se obtuvieron en el presente estudio son mayores a los reportados, probablemente porque la muestra era de menor edad (con un rango de edad de 22 a 58 años y una media de 31 años), mostrando con ello que la edad es un factor importante en la capacidad antioxidante total sérica.

En la evaluación de las muestras de saliva con la técnica de ABTS<sup>•+</sup>, se obtuvo un rango de 0,19 – 0,61 TEAC mmol/L (Tabla 1). Otras referencias como la de N. Kamodyova, et al. (2013, Eslovaquia)<sup>10</sup> indican para una población normal una CAT en saliva un rango de 0,4 – 1,1 TEAC mmol/L (con una media de 0,65 TEAC mmol/L). Así también en el inserto de un kit de reactivos comercial para pruebas que evalúan la capacidad antioxidante<sup>24</sup>, indican como rango

(basándose en estudios hechos en población de Yugoslavia) valores de 0,3 a 1 TEAC mmol/L. Ambos rangos son parecidos a los encontrados en el presente estudio.

Para las muestras de orina, se obtuvo un rango de 2,06 – 10,38 TEAC mmol/L (con una media de  $4,61 \pm 1,84$  mM) (Tabla 1). Bartosz (2003, USA)<sup>25</sup> reporta un valor de  $1,95 \pm 0,29$  mM en orina con esta técnica, aunque no precisa el procedimiento exacto ni la longitud de la medición. Campos, et al. (2009)<sup>11</sup> han reportado un valor de  $4,5 \pm 1,3$  mmol/L de orina, valor obtenido con una absorbancia inicial de  $0,7 \pm 0,02$  y a una longitud de onda de 734 nm; en un estudio con 20 personas en aparente estado de salud (6 hombres y 14 mujeres, con un promedio de edad de  $37 \pm 21$  años con un rango de 14 a 82 años). Los resultados del presente estudio se acercan al valor reportado por Campos et al, con la misma composición de género y aun con el rango de edad más amplio.

Para los ensayos realizados con la técnica del FRAP, al ser trabajada con muestras de suero se halló un rango para el CAT de 0,11 – 0,28 AEAC mmol/L y de 196 – 452  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$ , con una media de 318  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$  (Tabla 1). Estudios en donde de igual modo se aplica la técnica del FRAP en suero de personas saludables, como el de Fernández – Pachón, et al (2005)<sup>9</sup> realizado en España, señalan un valor de  $398 \pm 101$   $\mu\text{mol}/\text{L}$  en equivalentes al  $\text{FeSO}_4$ . Como vemos los valores son muy parecidos, lo cual si agregamos que las edades del estudio español son similares a las de este estudio, pues va desde los 25 a los 35 años, corrobora la importante que es el factor edad para comparar CAT.

Para la muestras de saliva se obtuvo un rango de 0,01 – 0,08 AEAC mmol/L y un rango de 20 – 146  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{L}$ , con una media de 79,3 (Tabla 1). En el estudio hecho por N. Kamodyova, et al (2013, Eslovakia)<sup>10</sup> reportó un rango de 80 – 350  $\mu\text{mol}/\text{L}$  en equivalente  $\text{FeSO}_4$  y una media de 215 en la misma unidad, valores que son ligeramente mayor al presente estudio. Se indica que la población es de menor edad que la del presente trabajo.

Finalmente para la muestra de orina se determinó un rango de 0,39 – 0,86 AEAC mmol/L, que en unidades equivalente a FeSO<sub>4</sub>, este rango es de 373 – 1341 μmol/L. No se encontró estudios con valores pares.

Todos los resultados discutidos muestran valores parecidos a los reportados por la literatura internacional, sin embargo hasta la actualidad no existen valores referenciales aceptados por los organismos especializados y se recomienda que cada población determine su propio grupo control, pues las poblaciones son distintas en hábitos diarios, etnicidad entre otros factores que hacen que el rango en cada población sea distinto. Así tenemos que los resultados obtenidos en el presente trabajo, constituyen un aporte para iniciar la conformación de grupos control para determinar el rango de valores de referencia de personas saludables para futuras investigaciones que usen muestras con características similares a las de nuestra población.

Con respecto a la correlación de la capacidad antioxidante total entre muestras de suero, saliva y orina mediante la aplicación de las dos técnicas de laboratorio, se ha hallado que para la técnica de ABTS<sup>+</sup> se muestra una correlación negativa estadísticamente débil entre suero-saliva de -0,315 marginalmente significativa ( $p < 0,075$ ) (Gráfica 1 y Anexo 7), mientras que para el caso suero-orina y saliva-orina, no se encontró una correlación, ya que se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0,165 y de -0,150 respectivamente (Gráfica 2 y 3), y su grados de significancia por encima de 0,1. (Anexo 7).

El análisis de correlaciones realizadas en los tres tipos de fluidos con la técnica de FRAP, mostró resultados diferentes. La correlación de suero-saliva disminuye en gran medida, llegando a un coeficiente de correlación de -0,0151 (Gráfica 4), mientras que por el contrario, la correlación suero-orina aumenta a 0,206 (Gráfica 5), indicando la existencia de un correlación positiva débil (Anexo 7). Para el caso de saliva-orina se obtuvo una correlación de -0,0859 (Gráfica 6).

Esta variación de correlaciones según el tipo de técnica usada es válida y justificada considerando que los fundamentos de ambas técnicas no son



iguales. En la técnica de ABTS<sup>+</sup> se genera un radical libre catiónico y en el FRAP se mide la capacidad reductora por cambio de hierro férrico a ferroso.

Cada muestra parece comportarse de diferentes maneras según la técnica empleada; así, según los resultados obtenidos, la capacidad antioxidante de la saliva se observa mejor con la técnica de ABTS, igualmente, la orina tendría un mejor comportamiento con la técnica del FRAP, siendo este un marcador más conveniente para la orina.

Comparando finalmente los resultados obtenidos en cada uno de los tipos de fluidos, para la técnica de ABTS<sup>+</sup> se muestra que la saliva es la de menor capacidad antioxidante, mientras que la de mayor capacidad es la de orina. Una situación igual se ve en los resultados hallados con el ensayo de FRAP, se observó que la muestra de menor poder reductor es la saliva y la de mayor capacidad es la orina. Esto concuerda al comparar los resultados que se mencionan en otros estudios, como el realizado por Torres P, et al. (2008)<sup>22</sup> donde si bien se aplica una técnica diferente a la de nuestro trabajo para la evaluación del CAT, la orina muestra una capacidad antioxidante superior al del suero.

## **IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **IX.1. Conclusiones**

El análisis de los resultados y la discusión realizada permite concluir en lo siguiente:

1.- Para ambas técnicas, ABTS<sup>+</sup> y FRAP, no existe una correlación significativa de la capacidad antioxidante total entre suero, saliva y orina.

2.- La correlación de Pearson entre suero-saliva para el ensayo de ABTS<sup>+</sup> y entre suero – orina, para el ensayo de FRAP, exhiben las mayores correlaciones negativa y positiva, respectivamente.

3.- La saliva, por las características y modo de obtención, es la muestra que presenta mayor variación en sus resultados.

4.- En ambas técnicas, la muestra biológica -en condiciones de aparente salud- con menor capacidad antioxidante total es la saliva, mientras que la de mayor capacidad es la orina.

### **IX.2. Recomendaciones**

1.- Incrementar el número de muestras de donantes con fines de significancia estadística.

2.- Estandarizar la toma de muestra de saliva.

3.- Incluir en el procesamiento de muestras de saliva y orina un paso de centrifugación antes del análisis.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Quintanar M; Calderón S. La Capacidad Antioxidante Total. Bases y Aplicaciones. REB. 2009; 28 (3) : 89 – 101.
- 2.- Rodríguez P, Menéndez L, Trujillo L. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cub Med Mil. 2001; 30 (1).
- 3.- Venéreo G. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med Milit. 2002 ; 31 (2) : 126 – 133.
4. - Dorado C, Rugenio C, Rivas S. Estrés Oxidativo y Neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 2003; 46 (6): 229 – 235.
5. - Soto-Bernardini M, Raventós-Vorst H. Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. AMC. 2008; 50 (4): 197 – 202.
6. - Wolff S. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. Br Med Bull. 1993; 49 (3): 642 – 652.
- 7.- Cao G, Russell M., Lischner N, et al. Serum Antioxidant Capacity Is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or Vitamin C in Elderly Women. J. Nutr. 1998; 128: 2383 – 2390.
- 8.- Seviá L, Trujillano J, Serrano J, et al. Plasma antioxidant capacity in critical polytraumatized patients? : methods, severity, and anatomic location. Critical Care. 2014, 18 : 434.
- 9.- Fernandez-Pachón M, Villaño D, Troncoso A, et al. Antioxidant Capacity of Plasma after Red Wine Intake in Human Volunteers. Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 2005.
10. - Kamodyová N, Tóthová L, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: Influence of external factors. Disease Markers. 2013; 34 : 313- 321.
11. – Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E., & Casado, Á. (2009). Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC–BCS assay. Analytical biochemistry, 392(1), 37-44
- 12.- Estrés Oxidativo [homepage en Internet]. México c2014 [actualizada en el 2014; consultado 02 de enero 2014]. Disponible en: <http://estresoxidativo.com/>

- 13.- Calvo G, López G. Ejercicio físico y radicales libres, ¿es necesaria una suplementación con antioxidantes? *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte* 2011; 12 (46) : 369 – 388.
- 14.- Montalvo C. Tejido Sanguíneo y Hematopoyesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina. [Consultado el 12 de noviembre 2014]. Disponible en: [http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal\\_recursos\\_linea/apuntes/Tejido-sanguineo.pdf](http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/Tejido-sanguineo.pdf)
- 15.- Machuca M. Bioquímica clínica y patología molecular. Especímenes: obtención, transporte y almacenamiento. En: Fuentes X, Castiñeiras M, Queraltó J. *Bioquímica clínica y Patología molecular*. Segunda edición. Barcelona: Editorial Reverté, S. A.; 1998. Pág: 617 – 627.
- 16.- Maderos A, Gotay A, Zaldivar G, Góngora M, Valcárcel B. Capacidad antioxidante total en pacientes cubanos con ataxia Espinocerebelosa tipo 2. *Rev Mex Neuroci*. 2006; 6 (3) : 201 – 206.
17. - Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 ; 11: E449- 455
- 18.- Fabre B, Mesch V, Oneto A, Macalini G, et al. La saliva y su utilidad en la evaluación de la función endocrinológica. *Revista SAEGRE*. 2009 ; 16 (3) : 26 – 46.
- 19.- Arroyo A, Mora A, Sánchez M, Barbal F, Palahí M. Drogas de abuso en saliva de conductores: aspectos médico-legales. *Revista española de Medicina Legal*. 2008 ; 34 : 3 - 10
- 20.- Momen J, Mansourian A, Momen F, Amanlou M, Obradov S. Evaluación del estado antioxidante salival y sérico en pacientes con estomatitis aftosa recidivante. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2011 ; 16 (3) : 141 – 145.
- 21.- Lourido H, Martínez G, Fleitas D, Fernández J. Ambiente redox salival: Comparación entre pacientes con enfermedad periodontal inflamatoria y pacientes periodontalmente sanos. *Rev Ciencias Médicas*. 2009 ; 13 (2).

- 22.- Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM. Ensayos antioxidantes en plasmas. Silvia Suarez Cunza. [consultado 01 abril 2014].  
Material Confidencial
- 23.- Bahr VA, Basulto LY. El Potencia Reductor Férrico (FRP). Un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante en suero. Correo Científico Médico de Holguín. 2004 ; 8 (4).
- 24.- Cayman Chemical Company. Antioxidant Assay Kit. Item No. 709001. 2014.
- 25.- Bartosz, G. Total Antioxidant Capacity.H. E. Spiegel, Advances in Clinical Chemistry. 2003 ; 37 : 355.
- 26.- Torres P, Galleguillos P, Lissi E, et al. Antioxidant capacity of human blood plasma and human urine: Simultaneous evaluation of the ORAC index and ascorbic acid concentration employing pyrogallol red as probe. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2008 ; 16 : 9171 – 9175

## XI. ANEXOS

### Anexo 1

#### “Correlación de la capacidad antioxidante total entre suero, saliva y orina empleando las técnicas de ABTS y FRAP”

##### **¿Qué son los niveles de estrés oxidativo?**



Antes de hablar sobre estrés oxidativo tenemos primero que hacer referencia a los **radicales libres**. Estos son elementos químicos que se producen en nosotros naturalmente debido a la oxidación que tenemos por el oxígeno que respiramos y que son utilizados para nuestra defensa, etc. Sin embargo, estas sustancias en **grandes cantidades pueden causar daño** ya que también tienen la capacidad de reaccionar con otros elementos importantes como lo son las proteínas, las grasas e inclusive el ADN, haciéndoles daño y alterando con ello el correcto desarrollo de sus funciones que son esenciales para conservar una **buena salud y causar a futuro diversas enfermedades**. A este daño se le denomina ESTRÉS OXIDATIVO. Sin embargo, nuestro organismo tiene una capacidad que eviten que este daño oxidativo aumente o progrese. A ello se le conoce como Capacidad Antioxidante.

##### **¿Hay pruebas que puedan indicar cómo se encuentra esta capacidad antioxidante?**

Actualmente si las hay y son pruebas bioquímicas que pueden determinar los niveles de diversos indicadores que reflejan el estado en el que se encuentra nuestro sistema oxidativo, y por ende nuestra capacidad antioxidante total.

##### **¿Qué tipo de muestras son utilizadas?**

La más común es el suero sanguíneo, el cual se obtiene mediante una punción venosa y posterior centrifugación. Sin embargo podrían existir otros tipos de muestras de obtención no invasivas, como por ejemplo la saliva y orina, muestras que aún no han sido utilizadas.

Es por lo ello que en este trabajo queremos investigar si es que este tipo de muestras se podrían usar para futuras determinaciones de indicadores de estrés oxidativo en donde la toma de sangre venosa fuese muy complicado.

Es esa la razón por la que le solicitamos su ayuda, para continuar con esta investigación.....gracias.

**Atte.**

Ochante Tejada Sonia Victoria  
Estudiante UNMSM – Interna INEN 2014

Cualquier consulta no dude en llamar al 997651378 o escribirme al correo:  
sonia\_ochante2706@hotmail.com

## Anexo 2



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN  
*"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del  
Compromiso Climático"*



ACTA N° 0197

CÓDIGO DE PROYECTO: N° 0276

### ACTA DE EVALUACIÓN ÉTICA

En Lima, a los cuatro días del mes de diciembre de 2014, se realizó la **revisión ética expeditiva** de las recomendaciones Metodológicas y Éticas incorporadas como sugerencias de corrección al proyecto: **"Correlación de la capacidad antioxidante total entre suero, saliva y orina empleando las técnicas de ABTS y FRAP"** que la Alumna, Sonia Victoria Ochante Tejada, ha cumplido satisfactoriamente.

**RESULTADO: PROYECTO APROBADO**

Lima, 4 de diciembre de 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
FACULTAD DE MEDICINA

DR. RICARDO TERUKINA TERUKINA  
Presidente  
del Comité de Ética de Investigación



## Anexo 3

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### **“Correlación de la capacidad antioxidante total entre suero, saliva y orina empleando las técnicas de ABTS y FRAP en personas saludables”**

Se le ha solicitado que participe en esta investigación, siendo el propósito de este documento explicarle en que consiste el estudio para que le ayude a tomar la decisión de aceptar esta invitación. Antes de decidirse a participar, puede tomarse todo el tiempo que considere necesario para realizar preguntas.

#### **Propósito del estudio**

El objetivo del presente proyecto es correlacionar la capacidad antioxidante total entre suero, saliva y orina empleando dos técnicas, el ABTS y FRAP. Lo hemos planteado en base a que el suero no es la única muestra biológica del que se puede obtener de la persona, si no que existen otras menos invasivas, de mayor facilidad de obtención y menor costo que pudieran servir para el análisis de estos parámetros oxidativos.

#### **Procedimiento**

Si decide participar, entonces

- a) Una persona con experiencia le extraerá 6 ml de sangre de la vena, según protocolos establecidos.
- b) Se le pedirá que nos brinde una muestra de saliva en el depósito que se le proporcionará.
- c) Se le pedirá que traiga una muestra de la primera orina del día en el depósito que se le dará previamente.

#### **Beneficios, riesgos y molestias**

Usted no obtendrá ningún beneficio directo por participar en este estudio. No obstante, al obtener los resultados de los análisis de laboratorio se le informará y sabrá sobre la capacidad antioxidativa en el que usted se encuentra.

Su participación en esta investigación puede ayudar al conocimiento de establecer si se puede o no usar como muestras biológicas alternativas a la saliva y orina para la realización de ensayos antioxidantes.

Los únicos riesgos y molestias físicas que podría sentir es durante la obtención de la muestra sanguínea, siendo estas las de cualquier extracción de sangre de vena. Probablemente sentirá un ligero dolor pasajero, enrojecimiento o irritación.

#### **Uso confidencial**

Todos los datos obtenidos son totalmente confidenciales, serán analizados con la reserva del caso y utilizados con los fines a los que presta el consentimiento informado.

**Consentimiento libre con conocimiento de causa**

La naturaleza y el propósito de esta investigación me han sido explicados y si quisiera al final del estudio podré preguntar más acerca del mismo. Tengo la libertad de poder retirarme en cualquier momento **sin necesidad de dar más explicaciones.**

He tomado pleno conocimiento de la información incluida en este formulario, comprendo los procedimientos y acepto participar voluntariamente.

**Persona contacto para el estudio**

Si tiene alguna pregunta o duda acerca de la investigación, sobre cualquier daño relacionado con la toma de muestra de sangre o sobre su retiro del estudio, debe contactar en cualquier momento con:

Srt. Sonia Ochante Tejada Cel: 997651378  
Correo: sonia\_ochante2706@hotmail.com

**Al firmar este documento doy libremente mi conformidad para el estudio**

Nombre completo: ..... DNI:  
.....

Fecha: .....

Código: .....

Firma del participante

Firma del responsable del estudio

## Anexo 4

### Cuestionario

Nombre:

COD:

EDAD:

Por favor responda las siguientes preguntas:

1.- Ha tenido buena salud en las últimas semanas

SI

NO

2.- Su alimentación ha variado en estos dos últimos días (exceso del consumo de carnes rojas, exceso de bebidas con o sin alcohol)

SI

NO

3.- Ha hecho ejercicio en exceso (adicional a los ejercicios diarios que realiza) en estos dos últimos días

SI

NO

4.- Padece de inflamación a las encías

SI

NO

5.- Sufre de tos con flema por más de quince días (dos semanas)

SI

NO

6.- Sufre de algún cuadro crónico (diabetes, hipertensión, etc.)

SI

NO

Si la respuesta es SI especifique cuál: .....

7.- Está tomando algún medicamento diurético

SI

NO

8.- Cumplió con todas las indicaciones dadas para la recolección de muestra de orina:

SI

NO

Si es NO especifique cuál: .....

## Anexo 5

**Tabla 2.** Resultados obtenidos mediante la técnica de ABTS<sup>+</sup> por tipo de muestra expresados en TEAC (mmol de Trolox/L de muestra problema). Cada número indica a un participante

|    | SUERO<br>(TEAC<br>mmol/L) | SALIVA<br>(TEAC<br>mmol/L) | ORINA<br>(TEAC<br>mmol/L) |
|----|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1  | 3.34                      | 0.22                       | 10.38                     |
| 2  | 3.55                      | 0.25                       | 4.40                      |
| 3  | 3.70                      | 0.32                       | 5.29                      |
| 4  | 2.92                      | 0.61                       | 3.45                      |
| 5  | 3.35                      | 0.56                       | 3.54                      |
| 6  | 3.05                      | 0.31                       | 2.17                      |
| 7  | 3.00                      | 0.40                       | 7.04                      |
| 8  | 3.20                      | 0.19                       | 5.17                      |
| 9  | 3.33                      | 0.20                       | 5.09                      |
| 10 | 2.80                      | 0.29                       | 6.18                      |
| 11 | 3.37                      | 0.32                       | 5.50                      |
| 12 | 3.38                      | 0.25                       | 2.45                      |
| 13 | 3.06                      | 0.22                       | 3.63                      |
| 14 | 3.45                      | 0.36                       | -                         |
| 15 | 2.57                      | 0.49                       | 5.43                      |
| 16 | 2.02                      | 0.56                       | 3.41                      |
| 17 | 2.34                      | 0.46                       | 4.55                      |
| 18 | 3.08                      | 0.29                       | 3.81                      |
| 19 | 2.98                      | 0.29                       | 5.41                      |
| 20 | 3.75                      | 0.35                       | 3.51                      |
| 21 | 2.35                      | 0.42                       | 3.41                      |
| 22 | 2.95                      | 0.29                       | 2.06                      |
| 23 | 3.77                      | 0.59                       | 5.63                      |

## Anexo 6

**Tabla 3.** Resultados obtenidos mediante la técnica de FRAP por tipo de muestra expresados en AEAC (mmol de Ácido Ascórbico/L de muestra problema). Cada número indica a un participante.

|    | SUERO<br>(AEAC<br>mmol/L) | SALIVA<br>(AEAC<br>mmol/L) | ORINA<br>(AEAC<br>mmol/L) |
|----|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1  | 0.23                      | 0.01                       | 0.67                      |
| 2  | 0.14                      | 0.03                       | 0.45                      |
| 3  | 0.23                      | 0.05                       | 0.52                      |
| 4  | 0.20                      | 0.07                       | 0.76                      |
| 5  | 0.24                      | 0.06                       | 0.77                      |
| 6  | 0.18                      | 0.08                       | 0.50                      |
| 7  | 0.16                      | 0.01                       | 0.70                      |
| 8  | 0.19                      | 0.02                       | 0.67                      |
| 9  | 0.15                      | 0.04                       | 0.75                      |
| 10 | 0.27                      | 0.03                       | 0.78                      |
| 11 | 0.13                      | 0.04                       | 0.81                      |
| 12 | 0.18                      | 0.02                       | 0.41                      |
| 13 | 0.19                      | 0.05                       | 0.39                      |
| 14 | 0.18                      | 0.08                       | -                         |
| 15 | 0.16                      | 0.04                       | 0.67                      |
| 16 | 0.24                      | 0.07                       | 0.62                      |
| 17 | 0.28                      | 0.02                       | 0.86                      |
| 18 | 0.14                      | 0.06                       | 0.62                      |
| 19 | 0.16                      | 0.01                       | 0.74                      |
| 20 | 0.20                      | 0.08                       | 0.52                      |
| 21 | 0.11                      | 0.08                       | 0.65                      |
| 22 | 0.27                      | 0.05                       | 0.56                      |
| 23 | 0.15                      | 0.01                       | 0.39                      |

## Anexo 7

**Tabla 4.** Correlación de Pearson y nivel de significancia para cada uno de los tipos de correlación analizada.

| ABTS <sup>+</sup> |                        |        | FRAP   |                        |         |
|-------------------|------------------------|--------|--------|------------------------|---------|
| Suero             | Saliva                 |        | Suero  | Saliva                 |         |
|                   | Correlación de Pearson | -0.315 |        | Correlación de Pearson | -0.0151 |
|                   | Sig (unilateral)       | 0.073  |        | Sig (unilateral)       | 0.45    |
|                   | N                      | 23     | N      | 23                     |         |
| Suero             | Orina                  |        | Suero  | Orina                  |         |
|                   | Correlación de Pearson | 0.165  |        | Correlación de Pearson | 0.206   |
|                   | Sig (bilareral)        | 0.462  |        | Sig (unilareral)       | 0.181   |
|                   | N                      | 22     | N      | 22                     |         |
| Saliva            | Orina                  |        | Saliva | Orina                  |         |
|                   | Correlación de Pearson | -0.15  |        | Correlación de Pearson | -0.0859 |
|                   | Sig (unilateral)       | 0.237  |        | Sig (unilateral)       | 0.34    |
|                   | N                      | 22     | N      | 22                     |         |