



UTILIZACIÓN DE LA LACASA EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN ALIMENTOS

Violeta Ugalde-Benítez¹, Jorge Soriano-Santos^{1*}, Isabel Guerrero-Legarreta¹ y Lidia Dorantes-Álvarez²

¹Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa Avenida Sn. Rafael Atlix No. 186. Colonia Vicentina. C. P. 09340, México D. F. Fax: (55)58044712; e-mail: *jss@xanum.uam.mx.

²Laboratorio de Enzimología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Santo Tomás C. P. 11340, México, D.F.

Palabras clave: ABTS/lacasa, actividad antioxidante total en alimentos, antioxidante.

Introducción. Es importante evaluar la actividad antioxidante total de los alimentos debido a que es una medida indirecta en la prevención de enfermedades provocadas por la acción de los radicales libres. La mayoría de los métodos para evaluar esta actividad se basan en la generación de radicales libres (1,2). Dichos métodos monitorean el tiempo de inhibición de la formación de un radical libre, por la acción de un antioxidante. El sistema 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS)/peroxidasa de rábano (HRP)/H₂O₂ se utiliza con frecuencia para evaluar la actividad antioxidante total de alimentos, debido a su excelente reproducibilidad. Sin embargo, éste método requiere de la adición de H₂O₂ para que la enzima HRP genere los radicales libres ABTS^{•+}. La enzima lacasa con actividad polifenol oxidasa genera ABTS^{•+} en presencia de oxígeno atmosférico (O₂) que se detecta a una longitud de onda de 728 nm (3,4). El objetivo del presente estudio fue optimizar el sistema ABTS/lacasa para el desarrollo de un método sencillo de evaluación de la actividad antioxidante total de alimentos.

Metodología. Se utilizaron lacasa (EC 1.10.3.2) de *Rhus vernicifera*, ABTS y ácido gálico (AG) como antioxidante de referencia. Se probó un diseño factorial 2² con un punto central a valores de pH de 3, 4 y 5 y lacasa (48.8 a 381.2 U/ml). Se utilizó ácido gálico (5 a 500 µM) como antioxidante de referencia. La detección del tiempo de inhibición de formación del radical ABTS^{•+} (tiempo lag) se detectó a λ=728 nm. Se observaron las condiciones a las cuales hay una correlación lineal entre el tiempo lag de formación del radical ABTS^{•+} y la concentración de AG para la construcción de una curva estándar, que permita la evaluación de la actividad antioxidante total en alimentos expresada como µM equivalentes de ácido gálico.

Resultados y discusión. Las condiciones óptimas en las que se observó una correlación lineal entre el tiempo lag de formación del radical ABTS^{•+} y la concentración de AG fueron: 231.5 U/mL de lacasa; ABTS 0.5 mM y ácido gálico (15, 20, 30, 40 y 50 µM) en amortiguador acetatos 0.1 M a pH 4. En la Fig. 1 se muestra la curva estándar obtenida a las condiciones antes mencionadas para la evaluación de la actividad antioxidante total en extractos acuosos de alimentos. Se observó que el ajuste a una recta (y=mx + b)

tuvo un coeficiente de correlación cercano a la unidad (0.9974).

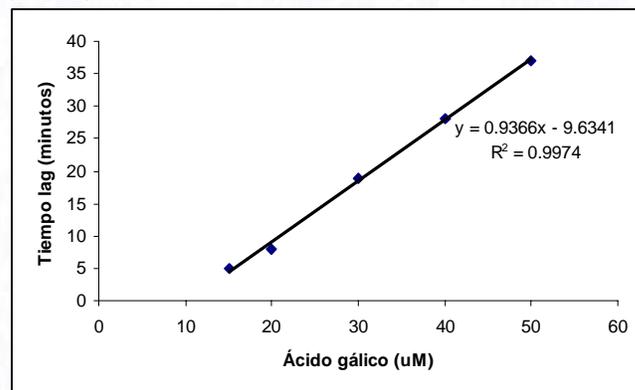


Fig 1. Tiempo lag de formación del radical ABTS^{•+} versus ácido gálico en el sistema ABTS/lacasa.

Conclusiones. El sistema ABTS/lacasa de *Rhus vernicifera* es útil para el desarrollo de un método sencillo para la evaluación de la actividad antioxidante total en alimentos, ya que la correlación entre la concentración de AG y el tiempo lag de inhibición de ABTS^{•+} se ajusta a una recta con un coeficiente de correlación cercano a 1. Este sistema solo requiere de O₂ atmosférico para la generación de ABTS^{•+} en amortiguador de acetatos a pH 4.

Bibliografía.

1. Arnao, M. B., Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F. and Acosta, M. (1996). Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal Biochem* **236**: 225-261.
2. Ing-Chien, C., Hui-Chi, C., Hui-Wen, Y. and Gan-Li, C. (2004). Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and chinese herbs: A fast approach with ABTS/H₂O₂/HRP system in microplates. *J Food Drug Anal* **12**: 29-33.
3. Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J Biotechnol* **78**:193-199.
4. Solis-Oba, M., Ugalde-Saldivar, V. M., González, I. and Viniegra-González, G. (2005). An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) produced by immobilized laccase. *J Electroanal Chem* **579**: 59-66.