



## **Casa abierta al tiempo**

**Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Xochimilco**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Lic. Química Farmacéutica Biológica  
Reporte de Servicio Social**

**Título de proyecto: Revisión de antioxidantes más utilizados  
en formulación farmacéutica disponibles en el mercado.**

**Proyecto Genérico: "Evaluación de Productos Relacionados  
con la Salud."**

**Nombre: Lydia Paulina Saucedo Zúñiga**

**Matrícula: 2163064722**

**Correo electrónico: 2163064722@alumnos.xoc.uam.mx**

**Asesores:**

**Dr. Martín Gómez Hernández- M. en C.F. Leticia Ortega Almanza  
No. Económico: 30641 - No. Económico: 35538**

**Duración: 10 de junio de 2021 al 10 de diciembre de 2021.**

**Lugar de realización: UAM Xochimilco - Modalidad remota.**

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO</b>	<b>2</b>
3.1 Oxidación	3
3.2 Radicales Libres	3
3.3 Antioxidantes	4
3.4 Clasificación de antioxidantes <sup>5</sup>	4
3.4.1 Por su naturaleza	4
3.4.2 Por su Solubilidad	4
3.4.3 Por su Mecanismo de Acción	5
3.5 Factores que influyen en la oxidación <sup>6,1</sup>	5
3.5.1 Luz (Foto-oxidación)	5
3.5.2 Valores de pH mayores al óptimo	5
3.5.3 Temperatura	6
3.5.4 Oxígeno “encapsulado” o atmosférico	6
3.5.5 Metales	6
3.6 Efectos de la oxidación en el medicamento	6
3.7 Propiedades más importantes que un antioxidante ideal debe cumplir en la preformulación de un fármaco	7
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
4.1 Objetivo General:	7
4.2 Objetivos Específicos:	7
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>8</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>8</b>
6.1 Mecanismo de acción de los antioxidantes más utilizados en la industria farmacéutica	8
6.1.1 Antioxidantes comúnmente utilizados para sistemas acuosos:	8
6.1.2 Antioxidantes comúnmente utilizados en sistemas de aceite:	10
6.1.3 Agentes sinergistas:	13
6.1.4 Agentes Quelantes:	13
6.2 Métodos más utilizados para la determinación de la actividad antioxidante	14
6.2.1 Ensayo de actividad antioxidante equivalente a Trolox (ensayo TEAC):	14
6.2.2 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ensayo ORAC):	15
6.2.3 Ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (ensayo de radicales DPPH):	17
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>20</b>

## 1. RESUMEN

Los antioxidantes se utilizan actualmente como excipientes efectivos para retrasar o inhibir el proceso de oxidación de moléculas. La capacidad oxidativa de estos excipientes es importante, para ello existen ensayos que nos ayudan a determinar la misma. Esta investigación se llevó a cabo para compilar los mecanismos de acción de los antioxidantes más utilizados en la industria farmacéutica, tales como Sulfito de sodio, Metabisulfito de sodio, Tiosulfato de Sodio, Ácido Ascórbico, Palmitato de ascorbilo (AP), Galato de propilo (PG), Hidroxitolueno butilado (BHT), Hidroxianisol butilado (BHA), Alfa-tocoferol ( $\alpha$ -TOH), Ácido Tartárico, Ácido Cítrico y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); así como los métodos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante, los cuales incluyen el ensayo de actividad antioxidante equivalente de Trolox (ensayo TEAC), el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ensayo ORAC) y el ensayo de 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (ensayo de radicales DPPH) para poder determinar especificaciones, diferencias entre los mismos ensayos, así como sus ventajas y desventajas.

Palabras clave: Antioxidante, Radicales libres, Oxidación.

## 2. ABSTRACT

Antioxidants are currently used as effective excipients to delay or inhibit the oxidation process of molecules. The oxidative capacity of these excipients is important, for this there are tests that help us determine it. This research was carried out to compile the mechanisms of action of the most widely used antioxidants in the pharmaceutical industry, such as Sodium Sulfite, Sodium Metabisulfite, Sodium Thiosulfate, Ascorbic Acid, Ascorbyl Palmitate (AP), Gallate Propyl (PG), Butylated Hydroxytoluene (BHT), Butylated Hydroxyanisole (BHA), Alpha-Tocopherol ( $\alpha$ -TOH), Tartaric Acid, Citric Acid and Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA); as well as the most widely used methods to determine antioxidant capacity, which include the Trolox equivalent antioxidant activity assay (TEAC assay), the oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC assay), and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical assay) in order to determine specifications, differences between the same tests, as well as their advantages and disadvantages.

Keywords: Antioxidant, Free radicals, Oxidation.

## 3. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

La calidad de un medicamento es de vital importancia para la industria farmacéutica, desde su formulación hasta el desarrollo y venta del mismo, es por ello que se desea evitar cualquier alteración que pueda dañar la vida útil, eficacia, seguridad, etc. de un medicamento, es por ello que se utilizan diferentes excipientes, como los antioxidantes, los cuales podrán prevenir la oxidación del fármaco.

Los antioxidantes son sustancias que disminuyen la generación de productos oxidados en un sistema de reacciones de radicales libres, los cuales pueden provocar la inestabilidad del principio activo y comprometer la calidad del medicamento, inhibiendo su actividad terapéutica.

Para determinar ésta capacidad antioxidante de los excipientes, existen diferentes métodos, los cuales incluyen el ensayo de actividad antioxidante equivalente de Trolox (ensayo TEAC), el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ensayo ORAC) y el ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (ensayo de radicales DPPH); los cuales ayudarán a elegir, dependiendo de su compatibilidad con el principio activo, cuál será el mejor antioxidante a utilizar en la formulación, que pueda brindar la mayor protección ante radicales libres en el producto final.

Actualmente los antioxidantes se introducen en la formulación para mejorar la vida útil de los productos farmacéuticos, protegiéndolos de especies reactivas de oxígeno y en ocasiones, de metales reactivos.

La producción de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres pueden derivarse de diferentes maneras en un medicamento, ya sea desde su producción o hasta la salida y uso del mismo; por ello, además de ser añadidos en la formulación del medicamento, también se elige el empaque contenedor pertinente del producto final para disminuir los efectos de la degradación oxidativa y así asegurar la calidad del medicamento, salvaguardando la estabilidad del principio activo, manteniendo sus características dentro de los límites, durante el período de vida útil.

### **3.1 Oxidación**

El término oxidación se puede definir como la incorporación de oxígeno en la estructura de un fármaco o como el proceso de convertir una sustancia química en otro derivado que lleva un menor número de electrones; se requiere de una pequeña cantidad de oxígeno para dar lugar a una reacción en cadena, debido a la formación de especies reactivas o radicales libres<sup>1</sup>.

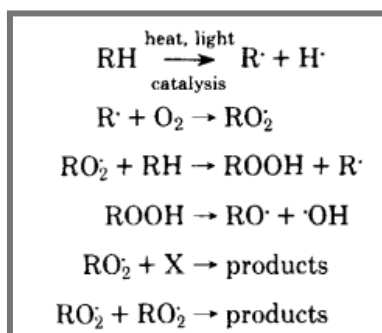
Este proceso de oxidación es influenciado directamente por valores de pH más altos que el óptimo, metales pesados polivalentes (por ejemplo, cobre y hierro), exposición al oxígeno e iluminación ultravioleta<sup>2</sup>.

Las dos últimas causas de oxidación justifican el uso de químicos antioxidantes, nitrógeno atmosférico durante el llenado de ampollas y viales, externo opaco (color ámbar) en envases primarios de vidrio o plástico de los medicamentos.

### **3.2 Radicales Libres**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica<sup>3</sup>. Sin embargo, al hacer esto, puede desestabilizar a otras moléculas en cadena; cuando vemos involucrado al oxígeno molecular, le llamamos "Auto oxidación" <sup>1</sup>, ésta reacción ocurre de manera espontánea, lenta y a temperatura ambiente.

Los radicales libres se producen por fisión de enlace homolítico de un enlace covalente<sup>4</sup>:  $A:B \rightarrow A^* + B^*$  (Imagen 1).



*Imagen 1. Esquema de la Auto-oxidación en cadena<sup>4</sup>.*

### 3.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que pueden neutralizar los radicales libres al aceptar o donar electrones para eliminar la condición no apareada del radical, de ésta manera, estos compuestos tienen la capacidad de inhibir, retardar o interrumpir las reacciones de oxidación; sin embargo, su efecto dependerá de sus potenciales de oxidación, los cuales deberán ser mayores que los de los otros componentes en la formulación<sup>4</sup>.

Los antioxidantes se añaden a la formulación para evitar la oxidación de las sustancias activas o excipientes en el producto terminado, este se elige basándose en sus diferentes mecanismos de acción y compatibilidad con el principio activo.

### 3.4 Clasificación de antioxidantes<sup>5</sup>

#### 3.4.1 Por su naturaleza

- Antioxidantes naturales: Son aquellos antioxidantes que se obtienen a partir de una fuente natural, entre ellos se encuentran: Ácido ascórbico (Vitamina C), Tocoferol (Vitamina E), Sesamol, Resina de guayaco y Metionina.
- Antioxidantes sintéticos: Se les denomina así, a aquellos antioxidantes que se obtienen a partir de una síntesis química, por ejemplo: Butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT).

#### 3.4.2 Por su Solubilidad

- Antioxidantes solubles en agua: Ácido cítrico, Ácido tartárico, Ácido fosfórico, Ácido ascórbico, Metabisulfito de sodio y derivados de tiol.

- Antioxidantes solubles en aceite: Butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT).

### 3.4.3 Por su Mecanismo de Acción

- Reductores: sustancias fácilmente oxidables que se consumen antes que el principio activo. Ácido ascórbico, bisulfito sódico, metabisulfito sódico, tiourea.
- Bloqueantes: bloquean la cadena de oxidación sin consumirse. Ésteres del ácido ascórbico, Butilhidroxitolueno (BHT), Tocoferoles.
- Sinérgicos: aumentan la efectividad de otros antioxidantes (a veces se suelen combinar). Ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico.
- Quelantes: forman complejos con los metales pesados que catalizan la oxidación, impidiendo su acción. Sales del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

## **3.5 Factores que influyen en la oxidación<sup>6,1</sup>**

### 3.5.1 Luz (Foto-oxidación)

La luz absorbida por un fármaco puede inducir divisiones para producir radicales, que reaccionan rápidamente con el oxígeno molecular (sin barrera de espín). De manera similar, la luz absorbida por los fotosensibilizadores puede reaccionar con el oxígeno para formar agentes oxidantes más reactivos, tales como peróxidos. Es por ello que para algunos medicamentos en particular, se protegen con blisters o botellas ámbar, o alguna forma de empaque secundario como bolsas de aluminio (generalmente se utiliza con líquidos para evitar la lixiviación de trazas de metales, como el hierro, del vidrio de color ámbar) para prevenir la fotooxidación.

### 3.5.2 Valores de pH mayores al óptimo

El pH puede afectar la estabilidad oxidativa de los fármacos ionizables, por esta razón, la estabilidad del fármaco frente a la oxidación suele ser mayor en condiciones de pH más bajo, que promueven su protonación, si esta es posible. Por el contrario, las condiciones de pH más alto, que desprotonan un fármaco, generalmente hacen a ése fármaco más susceptible a la oxidación.

El pH de una solución que contiene un medicamento, afectará la oxidación dependiendo del pKa del fármaco, suponiendo que el sitio de protonación está conjugado con el sitio de oxidación de la molécula; es por ello que se deben hacer estudios de la dependencia del pH a la oxidación, ya que existe un rango de pH

para la máxima estabilidad de cualquier preparación de antibióticos y vitaminas, que generalmente se puede lograr agregando un ácido, álcali o tampón

### 3.5.3 Temperatura

Aunque rara vez se observa el comportamiento de Arrhenius, se encuentra una indicación de la estabilidad oxidativa examinando la reactividad sobre el rango 5–70°C, para analizar el comportamiento oxidativo del medicamento, éste se somete a ensayos de Temperatura y Humedad Relativa (HR).

### 3.5.4 Oxígeno “encapsulado” o atmosférico

- Oxígeno en la cabeza de envases en formulaciones líquidas:

Este espacio con oxígeno atrapado en el envase primario, puede provocar la tendencia de un fármaco a oxidarse en una formulación particular; para evitar esto, el nitrógeno y el dióxido de carbono se utilizan con frecuencia para desplazar el aire del espacio superior en los envases farmacéuticos para ayudar a minimizar el deterioro por oxidación en formulaciones líquidas contenidas en ampollas o viales.

- Oxígeno atmosférico en formulaciones sólidas:

En la mayoría de los casos, es difícil determinar si la oxidación ocurre dentro de la mayor parte de un cristal o en sitios defectuosos o superficiales, donde la red cristalina es más débil y la exposición a los oxidantes es mayor.

El oxígeno molecular de la atmósfera se ha demostrado que reacciona con cristales orgánicos. Esta reactividad depende de la forma cristalina (morfología), que gobierna la permeabilidad y solubilidad del oxígeno en la matriz cristalina.

### 3.5.5 Metales

En la producción de un medicamento, puede existir la contaminación del fármaco o excipientes con trazas de metales.

Las formulaciones parenterales no deben entrar en contacto con iones de metales pesados durante su fabricación, envasado o almacenamiento.

Para evitar la oxidación por metales, se agrega la combinación de un donante de átomos de hidrógeno y un quelante de metales para disminuir sinérgicamente los efectos de la degradación oxidativa.

## **3.6 Efectos de la oxidación en el medicamento**

La oxidación del fármaco en los medicamentos, pueden comprometer la estabilidad química del mismo y por lo tanto, carecer de actividad terapéutica<sup>1</sup>.

Además, en los medicamentos de liberación retardada, la oxidación puede provocar pérdida en peso molecular, degradación oxidativa en polímeros la cual puede producir impurezas reactivas y grupos finales<sup>6</sup>.

### **3.7 Propiedades más importantes que un antioxidante ideal debe cumplir en la preformulación de un fármaco**

El antioxidante ideal para ser utilizado en una formulación farmacéutica debe ser estable y eficaz en un amplio rango de pH, soluble en su forma oxidada, incoloro, no tóxico, no volátil, no irritante, efectivo en bajas concentraciones, termoestable y compatible con el sistema de cierre del contenedor primario e ingredientes de la formulación<sup>1</sup>.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General:**

Realizar una revisión, el análisis y la descripción de los aditivos farmacéuticos con propiedades antioxidantes más utilizados y los métodos analíticos que existen para la determinación de su capacidad antioxidante.

### **4.2 Objetivos Específicos:**

- ❖ Buscar, analizar y clasificar los antioxidantes más utilizados en la industria farmacéutica.
- ❖ Investigar los mecanismos de acción de los antioxidantes dentro de las preparaciones farmacéuticas.
- ❖ Analizar los factores que influyen en la oxidación y las consecuencias que conlleva en la producción de un fármaco.
- ❖ Establecer las propiedades más importantes que un antioxidante ideal debe cumplir en la preformulación de un fármaco.
- ❖ Investigar, analizar y describir los métodos analíticos más utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante en las formulaciones farmacéuticas.
- ❖ Especificar ventajas y desventajas de cada método analítico y concluir en los métodos más factibles para la determinación de la capacidad antioxidante en las formulaciones farmacéuticas.



## **5. METODOLOGÍA**

1. Lectura y análisis de bibliografía proporcionada por el asesor y sitios web de investigación científica. En esta etapa se llevará a cabo la lectura y el análisis de artículos, manuales, libros especializados para introducir al tema al estudiante.
2. Búsqueda de información bibliográfica y generación de un compendio de información. Se realizará la búsqueda de información a través de bases de datos en base a palabras clave del tema, filtrado de artículos relevantes para el tema y la bibliografía seleccionada se revisará a detalle.
3. Inicio de la escritura del documento de Revisión bibliográfica. Una vez leída y analizada la información obtenida se generará un bosquejo que servirá de guía para estructurar el documento.
4. Revisión por parte del asesor del documento y retroalimentación del mismo. Se enviará al asesor el documento mensualmente para revisión y retroalimentación.
5. Búsqueda de la información y escritura del documento continuo. Se realizará la búsqueda de información complementaria proporcionada por el asesor y corrección de errores.
6. Revisión final por parte del asesor. En esta etapa se realizará la revisión del informe final con formato de artículo de revisión bibliográfica para la liberación del mismo y publicación en revista científica.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Mecanismo de acción de los antioxidantes más utilizados en la industria farmacéutica**

#### 6.1.1 Antioxidantes comúnmente utilizados para sistemas acuosos:

- Sulfito de sodio, Metabisulfito de sodio, Tiosulfato de Sodio:

Estas sustancias actúan como agentes reductores, los cuales ceden electrones a un agente oxidante; es decir, son preferentemente oxidados debido a un potencial de oxidación más bajo que el de los principios activos u otros excipientes en la formulación; de esta manera, sufren degradación preferencial, actuando como inhibidores de cadena de radicales libres al aportar un electrón y recibir el exceso de energía que posee la molécula activada protegiendo de esta forma de la oxidación al principio activo<sup>7</sup>.

La oxidación de bisulfito por radicales libres se presentará de manera escalonada, con un intento de introducir participantes radicales de una manera racionalizada. Se puede suponer que la producción de radicales  $\cdot\text{O}^{2-}$  y  $\cdot\text{OH}$  resultantes de la interacción entre el oxígeno y el agua precede o inicia el proceso de oxidación. El ion hidroxilo surge de la ionización del agua<sup>8</sup>.

Estas sustancias antioxidantes se utilizan en una concentración de 0.01 a 1.0% p/v<sup>7</sup>.

- **Ácido Ascórbico:**

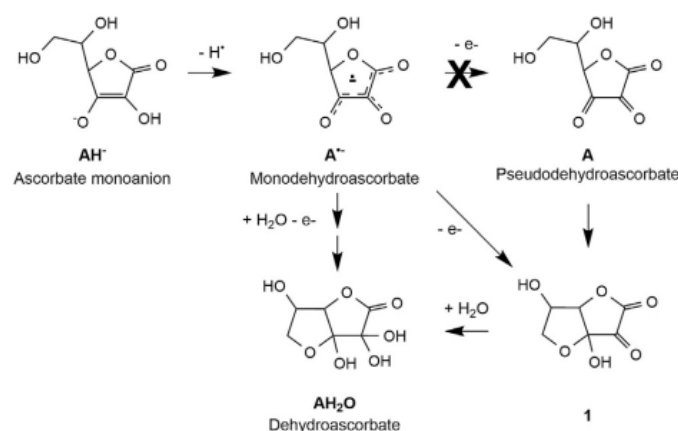
El ácido ascórbico es un conocido antioxidante y eliminador de radicales<sup>9</sup>.

Como agente reductor, el ácido ascórbico actúa como donante de equivalentes reductores únicos ciclando entre el ácido ascórbico completamente reducido y el anión radical (monodehidroascorbato) lo cual hace que el ácido ascórbico sea un buen eliminador de radicales libres.

El monodehidroascorbato reacciona preferentemente con otros radicales, es por ello que no es solo un eliminador de radicales libres sino un terminador de reacciones en cadena de radicales libres<sup>10,11</sup>.

Debido al pKa del ácido ascórbico, el anión ascorbato ( $\text{AH}\cdot^-$ ) es la forma predominante a pH fisiológico<sup>7</sup>; este radical ascorbato se obtiene de la primera oxidación del ácido ascórbico y su reactividad es algo inusual, ya que puede desproporcionarse o reaccionar con otros radicales, pero reacciona pobremente con especies no radicales.

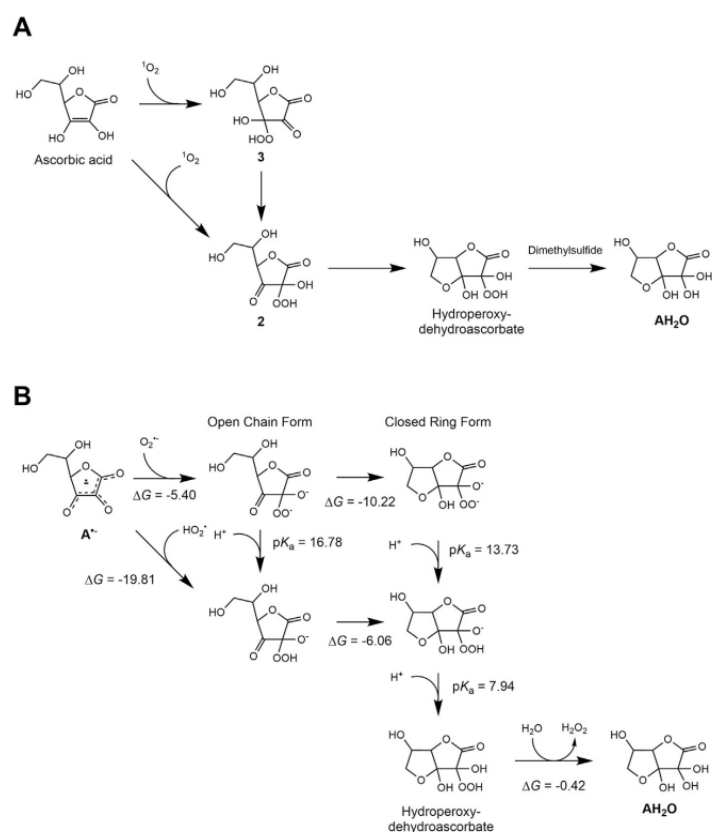
El radical ascorbato obtenido de la primera oxidación sufre una transferencia de un electrón que luego sufre cierre de anillo e hidratación para formar la forma hidratada bicíclica estable: ácido dehidroascórbico ( $\text{AH}_2\text{O}$ ), la cual es la forma completamente oxidada del ácido ascórbico (Imagen 2)<sup>10,11</sup>.



**Imagen 2.** Oxidación del ácido ascórbico<sup>10</sup>.

El papel antioxidante del anión ascorbato radica en su capacidad para reaccionar directamente con el radical superóxido, el radical hidroxilo y diversos hidroperóxidos (Imagen 3).

Cuando el ascorbato reduce estos radicales libres, se convierte en dehidroascorbato ( $AH_2O$ )<sup>7</sup>.



**Imagen 3.** A) Mecanismo de reacción del ácido ascórbico con oxígeno singlete ( $O_2$ ) produciendo hidropoxidehidroascorbato. B) Mecanismo hipotético de reacción de monodehidroascorbato con superóxido ( $O_2\bullet^-$ ) produciendo  $H_2O_2$  y dehidroascorbato<sup>10</sup>.

Otra función importante del ácido ascórbico es la de restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E; en este caso, el ascorbato se oxida al reducir los radicales tocoferilos originados en las reacciones de la vitamina E con los radicales libres.

Este antioxidante se emplea en formulaciones acuosas en un intervalo de concentración del 0.01 al 0.2% p/v<sup>7</sup>.

### 6.1.2 Antioxidantes comúnmente utilizados en sistemas de aceite:

- Palmitato de ascorbilo (AP) o Éster de Vitamina C:

El Palmitato ascorbilo es un éster formado por el ácido ascórbico (vitamina C) y el ácido palmítico creando una forma liposoluble de vitamina C<sup>12</sup>.

Es un potente antioxidante que protege los lípidos de la peroxidación y es un eliminador de radicales libres; éste antioxidante es utilizado particularmente en sistemas cerrados, para eliminar el oxígeno en el espacio de cabeza (empaquete primario del medicamento) y en solución.

La oxidación de un compuesto oleoso se debe, generalmente, a la fotosensibilización de compuestos fotodinámicos; formando así peróxidos conjugados (Hidroperóxidos) y no conjugados (formados por oxígeno singulete, iniciando así la autooxidación del producto); el palmitato de ascorbilo se incorpora en la fase oleosa para reducir la oxidación fotosensibilizada de aceites por el mecanismo de extinción del oxígeno singulete<sup>12,13</sup>.

Se suele combinar con otros antioxidantes (BHT, ácido cítrico, etc.) Para un efecto sinergista, incrementando los efectos de ambos.

- Galato de propilo (PG):

El Propil Galato, también conocido como galato de propilo, es un antioxidante que se caracteriza por ser un éster del ácido gálico, se utiliza en medicamentos tópicos. Se le considera un éster debido a que es un compuesto orgánico que se deriva de un ácido orgánico, como es el gálico, y tiene presencia de grupos orgánicos alquilo; cuando es combinado con BHA o BHT provee un buen sinergismo<sup>14</sup>.

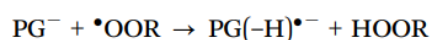
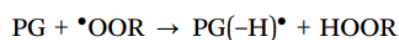
El PG forma quelatos con el Cu y el Fe, dando coloraciones azul negruzcas, por lo que se recomienda su uso con ácido cítrico como quelante<sup>15</sup>.

Estudios muestran que el galato de propilo reacciona principalmente a través del mecanismo de Transferencia de Hidrógeno (HT) (Imagen 4), independientemente del solvente o del radical peroxilo; una molécula de galato de propilo actúa como un eliminador de radicales peroxilo muy eficaz, tanto en medios acuosos como lipídicos<sup>16</sup>.

Los ésteres de galato rompen la cadena antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica al transferir un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo fenólico a los radicales lipídicos o radicales peroxilo lipídicos.

Durante este proceso, los radicales libres de galato semiquinona se unen eficazmente a los radicales lipídicos. Las estructuras formadas exhiben una estabilidad relativamente alta, por la cual los galatos son antioxidantes efectivos.

(i) Hydrogen transfer (HT)



**Imagen 4.** Reacción de Transferencia de Oxígeno (HT) del PG neutro y su forma desprotonada PG<sup>-</sup> con los radicales peroxilo<sup>16</sup>.

- Hidroxitolueno butilado (BHT) e Hidroxianisol butilado (BHA):

El butilhidroxitolueno (BHT) y el Hidroxianisol butilado (BHA), son antioxidantes sintéticos que puede usarse para retardar la oxidación lipídica con el objetivo de preservar y estabilizar los elementos más propensos a la oxidación.

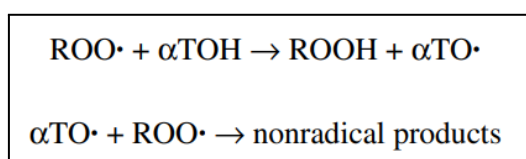
BHA y BHT son terminadores de radicales libres, los cuales no detienen la formación de los radicales que se generan en la oxidación, sino, al reaccionar con ellos los estabiliza y se producen radicales del antioxidante que son menos activos; estos antioxidantes actúan sinérgicamente para proporcionar una mayor actividad antioxidante que cualquier antioxidante solo<sup>17</sup>.

El mecanismo sinérgico de BHA y BHT incluye las interacciones de BHA con radicales peroxi para generar un radical fenoxi de BHA. Se estima que el radical fenoxi BHA obtiene un hidrógeno del grupo hidroxilo de BHT. BHT actúa positivamente como un reabastecedor de hidrógeno de BHA, permitiendo que BHA regenere su eficacia. El radical BHT puede reaccionar con un radical peroxi y actuar como un terminador de cadena<sup>18</sup>.

- Alfa-tocoferol (α-TOH):

El α-Tocoferol puede actuar como un antioxidante que rompe la cadena al eliminar el peroxilo lipídico altamente reactivo, secuestrando los radicales libres reduciéndolos a metabolitos menos activos<sup>19</sup>.

El α-TOH inhibe la autooxidación de lípidos mediante la eliminación de radicales peroxilo (ROO·) según las siguientes reacciones reacciones<sup>20</sup>:



**Imagen 5.** Reacciones entre el α-Tocoferol (αTOH y αTOH·) y los radicales peróxilo<sup>20</sup>.

EL TOH reacciona fácilmente con los radicales peroxilo para producir un hidroperóxido y el radical ~-tocoferoxilo estabilizado por resonancia (T'). Otras reacciones de T" producen dos grupos de productos no radicales (Imagen 5)<sup>20,21</sup>.

### 6.1.3 Agentes sinergistas:

Aumentan la actividad de los antioxidantes, generalmente compuestos orgánicos que complejan pequeñas cantidades de iones de metales pesados. Estos incluyen derivados del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido tartárico y ácido cítrico<sup>1</sup>.

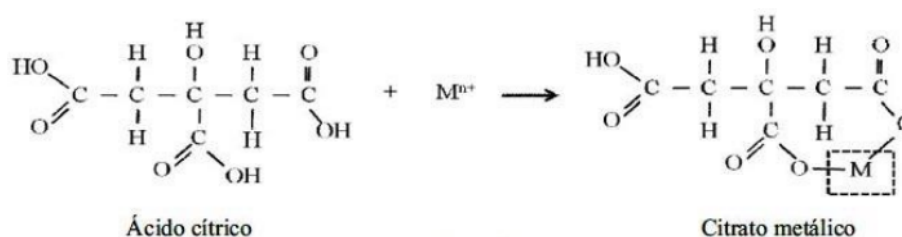
- **Ácido Tartárico:**

Este ácido orgánico, es utilizado para maximizar la actividad antioxidante de otras sustancias<sup>22</sup>, su capacidad antioxidante está basada en la transferencia de electrones; siendo éste un agente quelante que forma complejos con los metales que se involucran en las reacciones de oxidación<sup>23</sup>.

- **Ácido cítrico<sup>7</sup>:**

El ácido cítrico es ampliamente utilizado en las formulaciones farmacéuticas para ajustar el pH de preparados líquidos, pero también se puede utilizar como un agente secuestrante sinérgico de antioxidantes.

Su mecanismo de acción se basa en formar complejo con los metales que catalizan las reacciones de oxidación y como agente complejante su utiliza en el intervalo de concentraciones de 0.3-2% p/v.



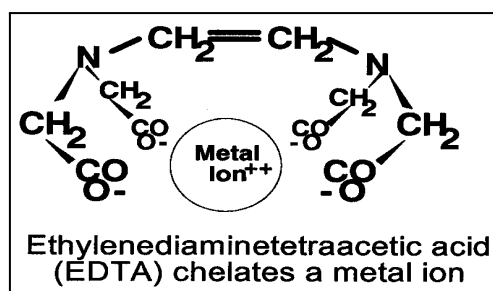
**Imagen 6.** Mecanismo de Complejación del ácido cítrico<sup>7</sup>.

### 6.1.4 Agentes Quelantes:

Se utilizan también agentes quelantes que interactúan con los metales pesados que catalizan la oxidación, el más utilizado es el Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA):**

El EDTA es un agente antioxidante, “secuestrante” de iones metálicos; presenta la propiedad química de combinarse con iones metálicos polivalentes en solución para formar complejos, particularmente con cobre, hierro y manganeso, que podrían catalizar reacciones de auto-oxidación<sup>24,25,1</sup>.



**Imagen 7. Mecanismo de Complejación del EDTA.**<sup>25</sup>

El ácido etilendiaminetetraacético se puede utilizar solo o en combinación con otros antioxidantes.

La concentración habitual empleado estando en el rango 0.005–0.1% p/v.

Se han utilizado edetatos para estabilizar el ácido ascórbico, penicilina, oxitetraciclina, prednisolona<sup>1</sup> corticosteroides, epinefrina, ácido fólico; formaldehído; gomas y resinas; hialuronidasa; hidrógeno; peróxido; oxitetraciclina; penicilina; ácido salicílico y ácidos grasos insaturados<sup>24</sup>.

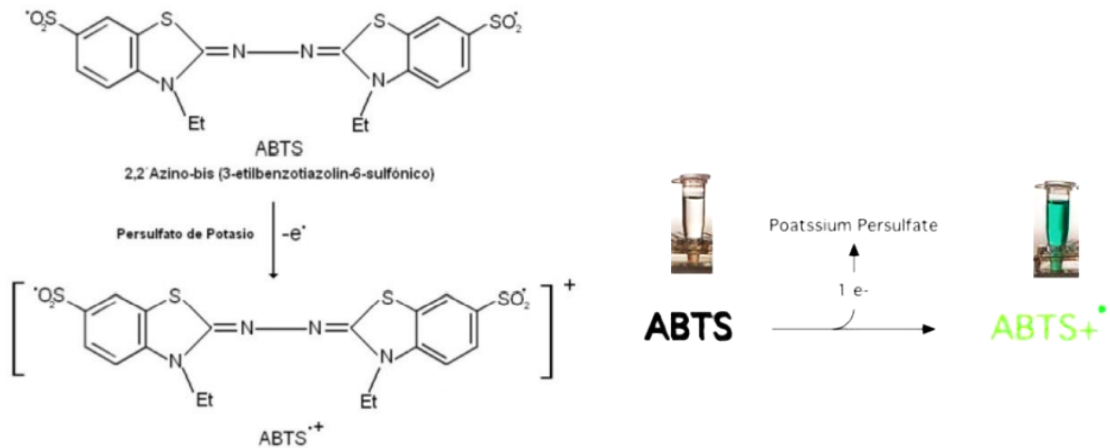
## 6.2 Métodos más utilizados para la determinación de la actividad antioxidante

### 6.2.1 Ensayo de actividad antioxidante equivalente a Trolox (ensayo TEAC):

El ensayo TEAC es una técnica espectrofotométrica que se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS•+, debido a la interacción con antioxidantes (especies donantes de hidrógeno o de electrones).

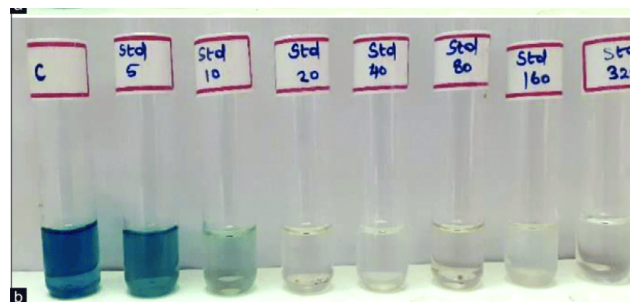
Éste radical es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y es generado por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) presentando un color azul-verde intenso con persulfato de potasio, antes de la reacción con los antioxidantes<sup>26,27</sup>.

Primero los cationes radicales de ABTS son generados a partir de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u otros oxidantes fuertes; posteriormente, los antioxidantes pueden neutralizar dichos cationes radicales mediante la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno, lo cual provocará que el catión radical (cromóforo) vaya perdiendo coloración y por lo tanto, la disminución de la absorción espectrofotométrica<sup>26</sup>.



**Imagen 8.** Formación del radical ABTS<sup>26</sup>.

El resultado se puede obtener a los 30 min de reacción a temperatura ambiente, en la oscuridad y se cuantifica con el porcentaje de inhibición de la formación catión radical ABTS por la muestra antioxidante añadida en un punto de tiempo fijo, los cuales se expresan en equivalentes de Trolox (mmol de Trolox/L de muestra problema)<sup>26,27</sup>.



**Imagen 9.** Reacción ABTS con antioxidantes.

Este método es aplicable para el estudio de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles.

### 6.2.2 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ensayo ORAC):

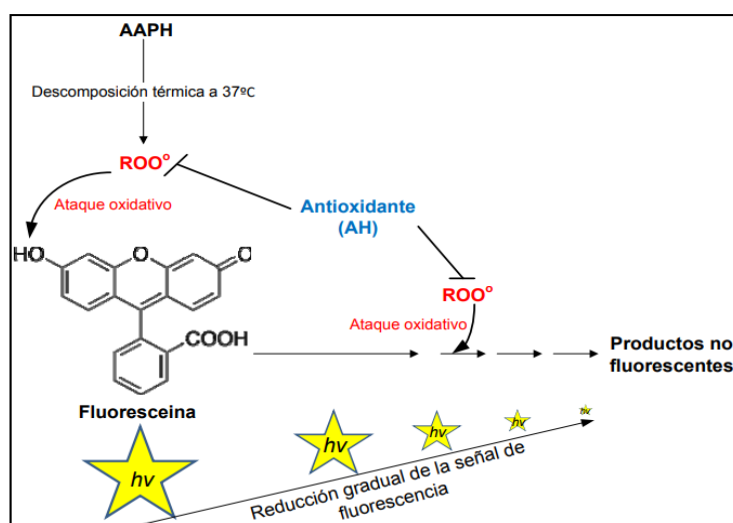
Este método se fundamenta en la oxidación de la fluoresceína (sonda de fluorescencia) producida por radicales peroxilos (ROO. ) los cuales serán generados por descomposición térmica de un azoderivado AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro).

Estos radicales peroxilos (ROO. ) intentarán oxidar un sensor/marcador oxidable y fluorescente (una proteína como la ficoeritrina o un sensor fluorescente como la fluoresceína), mientras que al añadir el antioxidante, éste reacciona con los radicales peroxilo, retardando así la oxidación de la fluoresceína y

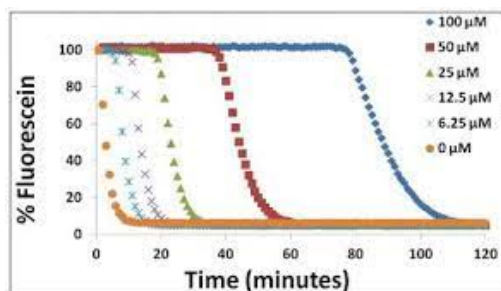


consecuentemente evitando la pérdida de fluorescencia; es decir, a medida que el radical oxide, el sensor fluorescente irá perdiendo poco a poco su fluorescencia y por el contrario, mientras el antioxidante evite dicha oxidación el sensor fluorescente irá manteniendo poco a poco su fluorescencia, la cual se registrará con un fluorómetro con  $\lambda_{emisión} = 538 \text{ nm}$  y  $\lambda_{excitación} = 485 \text{ nm}$  durante 105 minutos a intervalos de 1.5 minutos. Antes de cada lectura de fluorescencia, la placa se agita automáticamente a 1020 rpm durante 2 s para evitar la inclinación del meniscus en los pocillos que puede ocasionar la pérdida de exactitud en las mediciones<sup>26,27,28</sup>.

El ensayo se lleva a cabo a un pH=7.4, utilizando un buffer de fosfato, el cual se añade a la muestra, dejando incubar a 37°C durante 10 minutos<sup>28</sup>.



**Imagen 10.** Mecanismo simplificado de oxidación de fluoresceína mediante  $ROO^\bullet$  generado por descomposición térmica del AAPH.  $\leftarrow$  representa bloqueo y  $\rightarrow$  representa activación<sup>28</sup>.



**Imagen 11.** Curva de aumento en el tiempo de permanencia de fluorescencia en la prueba<sup>26</sup>.

Para calcular la capacidad antioxidante se utilizarán las diferencias de áreas bajo la curva del decaimiento de la fluoresceína entre el blanco. Para poder comparar los resultados obtenidos, en distintas muestras y matrices, la muestra, se compara

contra la curva del Trolox y se expresa en equivalentes de Trolox (análogo de la vitamina E), y se expresa en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra ( $\mu\text{mol Tx/g muestra}$ ), de acuerdo con la ecuación 1<sup>27</sup>:

$$\mathbf{Ec\ 1. ORAC} = \frac{(AUC - AUC^{\circ})}{(AUC_{\text{Trolox}} - AUC^{\circ})} f[\text{Trolox}]$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra,  $AUC^{\circ}$  área bajo la curva para el control,  $AUC_{\text{Trolox}}$  área bajo la curva para el Trolox,  $f$  es el factor de dilución de los extractos.

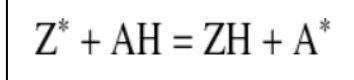
Este método tiene una alta especificidad; sin embargo, una desventaja frente a otros métodos es que el ensayo ORAC requiere de 70 minutos para su realización.

### 6.2.3 Ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (ensayo de radicales DPPH):

Este método se basa en la cuantificación de la capacidad captadora de radicales libres de los activos en una muestra, utilizando un radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH;  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) en solución metanólica, el cual presenta un color morado característico.

El fundamento del ensayo se basa en la cuantificación del cambio de éste color morado a amarillo; al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, el DPPH dará su forma reducida y por lo tanto, pérdida del color violeta<sup>29</sup>, es decir, cuanto más se reduce el radical DPPH (violeta) para DPPH-H, menor será el valor de absorbancia en la mezcla de reacción a 517 nm., obteniendo así una curva decreciente<sup>27,29,30,31</sup>.

Representando el radical DPPH por  $Z^{\bullet}$  y la molécula donante por AH, la reacción primaria es:

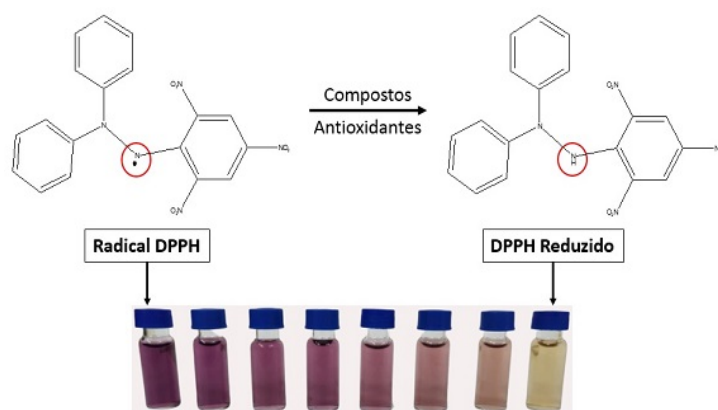


**Imagen 12.** Reacción entre el DPPH ( $Z^{\bullet}$ ) y un antioxidante donador (AH)<sup>30</sup>.

Donde ZH es la forma reducida y  $A^{\bullet}$  es el radical libre producido en el primer paso. El último radical sufrirá reacciones adicionales que controlarán la estequiometría general. Por lo tanto, la reacción primaria tiene por objeto establecer la relación con las reacciones que se desencadenan en un sistema oxidante, como la autooxidación de un lípido u otra sustancia insaturada; en éste caso, la molécula de DPPH ( $Z^{\bullet}$ )

tiene como propósito representar los radicales libres formados en un sistema, cuya actividad debe ser inhibida por la sustancia antioxidante (AH)<sup>30</sup>.

El DPPH se caracteriza como un radical libre en virtud de la deslocalización del electrón en el átomo de nitrógeno, dicha deslocalización da lugar al color morado de la muestra; éste electrón impar se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la hidracina correspondiente<sup>30</sup>:



**Imagen 13.** Reacción de reducción del radical DPPH por acción de compuestos antioxidantes. Fuente de imagen:

<http://www.abq.org.br/cbq/2019/trabalhos/6/1152-27705.html>

Los resultados se obtienen a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad, a una absorbancia de 517 nm. y se expresan como valores TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX<sup>®27</sup> o sustituyendo en fórmula para obtener el % de actividad antioxidante<sup>31</sup>:

$$\% \text{ AAO} = \frac{(\text{Abs Controle DPPH} - \text{Abs amostra}) \times 100}{\text{Abs Controle DPPH}}$$

Éste método es económico, rápido y sencillo; es mayormente empleado para medir la capacidad de los compuestos para ser determinados como captadores de radicales libres o donantes de hidrógeno y también para evaluar la actividad antioxidante.

Los resultados pueden ser reproducibles y son comparables con otros métodos de eliminación de radicales libres.

La ventaja de este método es que se permite que el DPPH reaccione con toda la muestra y da el tiempo suficiente para que éste reaccione lentamente, incluso con antioxidantes débiles. El método DPPH se puede utilizar en solventes orgánicos

acuosos y no polares, es por ello que se puede usar para examinar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos<sup>30</sup>.

## 7. CONCLUSIÓN

Los antioxidantes en la industria farmacéutica sigue siendo un tema actual, ya que son de mucha importancia para la elaboración de medicamentos debido a su actividad inhibitoria de los radicales libres, por ejemplo los radicales peroxilo, radicales hidroxilo, anión superóxido u oxígeno singlete; los cuales en una formulación farmacéutica causan oxidación y por lo tanto la pérdida de su actividad terapéutica; es por ello que a lo largo del tiempo se han utilizado diferentes métodos como el Ensayo de actividad antioxidante equivalente a Trolox (ensayo TEAC), Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ensayo ORAC) y Ensayo de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (ensayo de radicales DPPH), los cuales son los métodos más comunes utilizados para poder determinar ésta actividad antioxidante y de ésta manera, poder medir la capacidad de inhibir los radicales libres de diferentes tipos de aditivos para poder elegir el antioxidante pertinente para una formulación en particular.

Los antioxidantes más utilizados en la industria farmacéutica para sistemas acuosos son : Sulfitos de sodio, Metabisulfito de sodio, Tiosulfato de sodio, Ácido ascórbico; para sistemas oleosos son: Palmitato de ascorbilo (éster de vitamina C), Galato de Propilo, Hidroxitolueno butilado (BHT), Hidroxianisol butilado (BHA), Alfa-tocoferol; como agentes sinergistas: Ácido tartárico, Ácido cítrico y como quelantes: Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Para añadir cualquiera de estos antioxidantes a una formulación, se debe revisar su compatibilidad y función anti-radicales libres adecuados al principio activo y los demás excipientes, la forma farmacéutica, recipiente contenedor, etc.

Por lo tanto, podemos afirmar que los antioxidantes han tomado relevancia en la producción de medicamentos, ya que la industria farmacéutica está comprometida en poder brindar productos de calidad, con tiempo de vida útil en función de salvaguardar la estabilidad del principio activo frente a diferentes factores que podrían comprometer la misma, con el propósito de cumplir con las necesidades de los pacientes.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vadas, E.B. (2013). *Stability of Pharmaceutical Products*. Remington: the science and practice of pharmacy. 22<sup>o</sup> Ed. Médica. Panamericana, Buenos Aires. p. 44-43 y 683.
2. Smith, M.B.; March, J. (2007). *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*. New Jersey: Ed. John Wiley & Sons., p.1158-1161.
3. Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, (494), p. 161-172. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32849410>
4. Mollica, J. A., Ahuja, S., Cohen, J. (1978). Stability of pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 67 (4), p. 443–465. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jps.2600670405>
5. Flores C., Antioxidantes y Conservadores Utilizados en la Industria Farmacéutica. (2015). Universidad de el salvador, Facultad de Química y Farmacia, Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica. Disponible en: <https://www.academia.edu/12106351/CONSERVADORES>
6. Waterman, K. C., Adami, R. C., Alsante, K. M., Hong, J., Landis, M. S., Lombardo, F., & Roberts, C. J. (2002). Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharmaceutical development and technology*, 7(1), 1–32. Disponible en: <https://doi.org/10.1081/pdt-120002237>
7. Germán, D. B. (2016). Tesis: Influencia de diferentes antioxidantes en el equilibrio de complejación acz-hp-β-cd: aplicación al desarrollo de una formulación oftálmica. Para obtener el grado en Farmacia. Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia. España. [Revisado el 04 de abril, 2022]
8. Schroeter L. C. (1961). Sulfurous acid salts as pharmaceutical antioxidants. *Journal of pharmaceutical sciences*, (5) p. 891–901. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jps.2600501102>
9. Pehlivan, F. E. (2017) 'Vitamin C: An Antioxidant Agent', IntechOpen, London. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/56013>
10. Njus D., et al. (2020) Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 159, p. 37-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>.
11. Yi-Jung T., et al. (2017). A theoretical study of ascorbic acid oxidation and HOO / O<sub>2</sub> - Radical scavenging. *Org. Biomol. Chem.* 15. 10.1039/C7OB00791D.
12. Lee, K.H., Jung, M.Y. & Kim, S.Y. (1997). Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. *J Amer Oil Chem Soc* 74, p. 1053–1057 . Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0024-1>
13. Cort, W.M. (1974), Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. *J Am Oil Chem Soc* 51. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF02633006>

14. Propil Galato (PG):  
<https://www.quiminet.com/articulos/conozca-la-funcion-del-antioxidante-propil-galato-pg-2710079.htm> [Revisado el 04 de abril, 2022]
15. Alberto, S. M. (2008). Tesis: Uso de antioxidantes para la estabilidad oxidativa de la pulpa de anchoveta (*Engraulis ringens*) almacenada en congelación. Para obtener el grado en maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. [Revisado el 04 de abril, 2022]  
[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/229/Salas\\_m\\_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/229/Salas_m_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
16. Medina, M. E., Iuga, C., & Alvarez-Idaboy, J. R. (2013). Antioxidant activity of propyl gallate in aqueous and lipid media: a theoretical study. *Physical chemistry chemical physics* : PCCP, 15(31), p. 13137–13146. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/c3cp51644j>
17. José C., Roger R., Emilio D. (2002). Efecto sinérgico del Butil-hidroxi-tolueno (BHT) y ácido ascórbico en un producto cereal lacteado. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, v.2, n° 1, p. 89 - 95. Disponible en: <https://www.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol2/9.pdf>
18. Jean, C., H. (2019). Tesis: Reacciones de rancidez presentes en la elaboración de frituras vegetales, mecanismo de acción y sus potenciales agentes inhibidores. Para obtener el grado en Ingeniería. Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud. Machala. [Revisado el 04 de abril, 2022]: [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15055/1/E-10566\\_CABRERA%20HIDALGO%20JEAN%20CARLOS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15055/1/E-10566_CABRERA%20HIDALGO%20JEAN%20CARLOS.pdf)
19. Mäkinen, Kamal-Eldin M., Afaf & Lampi, A.-M & Hopia, Anu. (2000). Effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols on formation of hydroperoxides and two decomposition products from methyl linoleate. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77. p. 801-806.
20. Suárez, G. M., López, C. M., Ramírez, H. E., Ezquerro, J. M., Ruiz, S., & Torres, W. (2016). Role of Endogenous and Exogenous Tocopherols in the Lipid Stability of Marine Oil Systems: A Review. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1968. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms17121968>
21. Liebler, D. C., & Burr, J. A. (1995). Antioxidant stoichiometry and the oxidative fate of vitamin E in peroxy radical scavenging reactions. *Lipids*, 30(9), p. 789–793. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/BF02533953>
22. Tartaric Acid Handle. Disponible en: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tartaric%20acid%20report%202011%282%29.pdf> [Consultado el 12 de abril, 2022]
23. Sharma, M., Kumar, V., Bhardwaj, R. *et al.* (2020) Tartaric Acid Mediated Cr Hyperaccumulation and Biochemical alterations in seedlings of *Hordeum*

- vulgare* L.. *J Plant Growth Regul* 39, p. 1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09959-0>
24. Raymond C., Paul J. & Marian E. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6° Ed., Pharmaceutical Press. London. p. 247.
25. Los Compuestos de Coordinación y su importancia biológica e industrial. Disponible en: <http://al-quimicos.blogspot.com/2010/04/los-compuestos-de-coordinacion-y-s>  
[u.html](http://al-quimicos.blogspot.com/2010/04/los-compuestos-de-coordinacion-y-s) [Consultado el 13 de abril, 2022]
26. Huet B., C. (2017). Tesis: Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas. Para obtener el grado en Farmacia. Universidad Complutense, Facultad de Farmacia. Madrid, España. [Revisado el 20 de abril, 2022]: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20HUET%20BRE%20C3%91A.pdf>
27. Mesa, A. M.; Rincón, D. C.; Toro, J. F.; Tamayo, A. B. & Rojano, B. A.. (2011). Actividad antioxidante de Piper Piedecuestanum Trel. & Yunck. y Piper Subpedale Trel. & Yunck. *Revista latinoamericana de química*, 39(3), 91-99. Recuperado en 30 de junio de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-5943201100200001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-5943201100200001&lng=es&tlng=es).
28. Pacheco, E. M. (2011) Tesis Doctoral: Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante plasmática en la insuficiencia venosa. Universidad Autónoma de Madrid, España. [Revisado el 02 de junio, 2022]: [https://www.clinicazurbano.com/images/Clinica/investigacion/pdfs/BIOMARCADORES\\_DE ESTRS OXIDATIVO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PLASMTICA\\_EN\\_LA\\_INSUFICIENCIA\\_VENOSA\\_Tesis\\_doctoral\\_Dr\\_Elio\\_Mujica\\_Pacheco\\_UAM\\_2011-min.pdf](https://www.clinicazurbano.com/images/Clinica/investigacion/pdfs/BIOMARCADORES_DE ESTRS OXIDATIVO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PLASMTICA_EN_LA_INSUFICIENCIA_VENOSA_Tesis_doctoral_Dr_Elio_Mujica_Pacheco_UAM_2011-min.pdf)
29. Rahman, M.M., Islam, M.B., Biswas, M. *et al.* (2015) In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Res Notes* 8, 621. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1618-6>
30. Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412–422. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
31. Janaína Pires, Torres, P. B., Fungyi Chow, & Santos, D. (2017). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. *Unpublished*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27450.08640>

**Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos.**



---

M. en C.F. Leticia Ortega Almanza  
Asesor Interno  
No. Económico: 35538



---

Dr. Martín Gómez Hernández  
Asesor Externo  
No. Económico: 30641