


<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

# **Procedimiento de ensayo Determinación de Actividad Antioxidante ORAC**

**AOXLAB S.A.S.**

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-060 Procedimiento de ensayo determinación de Actividad Antioxidante ORAC

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Mariana Toro Rúa	Analista laboratorio		2025-03-29
<b>Revisó:</b>	Angela P. Patiño Pérez	Directora de Calidad		2025-03-30
<b>Aprobó:</b>	Jonatan Zárate Álvarez	Director Técnico		2025-03-30
<b>Localización del documento:</b>	<a href="#">Plataforma SGC</a>			


### Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018/01/09	1	Ninguno (versión original).	WFRP	NBR	YELP
Obsoleto	2019/06/26	2	Se estableció el control de aseguramiento de calidad del método.	WFRP	DPP	YELP
Obsoleto	2020-08-27	3	Se corrigió al método de referencia del ensayo	JCVG	DPP	YELP
Obsoleto	2021-03-01	4	Se modifica el alcance del método. Se cambia el logo y los colores	JCVG	DPP	YELP
Obsoleto	2023-06-01	5	Se actualizan las referencias bibliográficas a los documentos normativos	DPP	APPP	DPP
Vigente	2025-03-29	6	Se actualiza la sección de adicionados en el control de calidad analítico. Se establece la preparación de la curva de calibración	MTR	APPP	JOZA


	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>OBJETIVO Y ALCANCE.</b>	5
1.1	<b>Objetivo.</b>	5
1.2	<b>Alcance.</b>	5
<b>2.</b>	<b>DEFINICIONES Y NOTACIONES.</b>	5
2.1	<b>Definiciones.</b>	5
	<b>Notaciones.</b>	6
<b>3.</b>	<b>REFERENCIAS.</b>	6
<b>4.</b>	<b>DESARROLLO</b>	7
4.1	<b>Equipos de medición.</b>	7
4.2	<b>Condiciones generales</b>	7
4.2.1	Inspección visual.	7
4.2.2	Estabilización.	7
4.2.3	Verificación del equipamiento.	8
4.3	<b>Manejo de la muestra.</b>	8
4.4	<b>Medidas de seguridad.</b>	9
4.5	<b>Instrucciones de ensayo.</b>	9
4.5.1	Reactivos necesarios	9
4.5.2	<b>Soluciones</b>	10
4.5.3	<b>Estándares y adicionados</b>	11
4.5.4	Preparación de la muestra	12
4.5.4.1	Preparación de la muestra para ORAC Hidrofílico	12
4.5.4.2	<b>Preparación de la muestra para ORAC Lipofílico</b>	12
4.5.5	Procedimiento de ensayo	12
4.5.5.1	Preparación de curva de calibración	12
4.5.5.2	Preparación de análisis (Incubación y lectura)	13
4.6	<b>Informe de resultados</b>	15
4.7	<b>Control de calidad</b>	16
<b>5.</b>	<b>RESPONSABILIDADES.</b>	18
5.1	<b>Director técnico.</b>	18
5.2	<b>Líder de calidad.</b>	18
5.3	<b>Líder de laboratorio.</b>	18

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

<b>5.4</b>	<b>Analista.</b>	19
<b>6.</b>	<b>FORMATOS RELACIONADOS.</b>	19
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.</b>	19

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

El objetivo de este procedimiento es detallar los pasos necesarios para llevar a cabo el análisis de determinación de la actividad antioxidante mediante el método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno), conforme a la norma AOAC 2012.23 [3]. Además, se asegura el cumplimiento de los requisitos establecidos por la norma NTC-ISO/IEC 17025:2017 [1], garantizando la precisión, exactitud y trazabilidad de los resultados obtenidos.

### 1.2 Alcance.

El método es aplicable a las siguientes matrices:

- Alimentos

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

#### **Documento [2].**

Información y su medio de soporte.

#### **Ensayo/prueba [2].**

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

#### **Procedimiento [2].**


Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

#### **ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) [3]**

El método ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno) es una técnica utilizada para medir la actividad antioxidante de diferentes sustancias. Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes para neutralizar los radicales libres, específicamente los radicales peroxilo.

El procedimiento implica la utilización de fluoresceína como marcador, que emite fluorescencia cuando se oxida. La muestra antioxidante se añade a una solución que contiene AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro), un generador de radicales peroxilo. La fluorescencia se mide a intervalos regulares, y la disminución de la fluorescencia indica la capacidad antioxidante de la muestra.

Los resultados se expresan en términos de Trolox equivalentes, una forma estándar de comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

Este método es ampliamente utilizado en investigaciones científicas y en la industria alimentaria para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos, suplementos y otros productos.

**Notaciones.**

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:


“**Laboratorio**”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“**Servicios**”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“**Ítem**”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

**3. REFERENCIAS.**

- [1] International Organization for Standardization. (2023). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. (ISO standard No.17025:2017).
- [2] International Organization for Standardization. (2023). Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary. (ISO standard No. 9000:2015)
- [3] Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22<sup>nd</sup> Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 2012.23

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

## 4. DESARROLLO

### 4.1 Equipos de medición.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos:

<b>Patrones (o materiales), equipos y/o componentes clave</b>
Balanza analítica con resolución de 0,1 mg
Pipeta de volumen variable 20 µL – 200 µL
Pipeta de volumen variable 100 µL a 1000µL
Espectrofluorímetro capaz de leer microplacas de 96 pozos a con filtro de excitación a 420 nm ± 20 nm y filtro de lectura 530 nm ±25 nm. Y temperatura de reacción de 37°C ±1°C
Vortex de agitación o shaker orbital
Centrifuga capaz de mantener 7500 rpm por 15 minutos
Microplacas Elisa de 96 pozos fondo plano
pH-metro con una exactitud de ± 0.1

### 4.2 Condiciones generales

#### 4.2.1 Inspección visual.


Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que se cuenta con mínimo 10 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, realizar la observación en el FOR-TC-051 "Formato para el registro de datos primarios del ensayo de ORAC", e informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

#### 4.2.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

La balanza analítica, el pH-metro, y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso.

Antes de iniciar el análisis se deberá estabilizar el espectrofotómetro de la siguiente forma:

- Encender el equipo 30 minutos antes de comenzar el análisis.
- Se inicia el software GEN5 del Espectrofluorímetro que se encuentra en el escritorio del computador de espectrofotometría.
- Se busca el método de ORAC en la carpeta de espectrofotometría siguiendo la siguiente ruta:
  - L:\LABORATORIO\2024\Registros RG-RT\Registros espectrofotometría\Protocolos de lectura Espectrofluorímetro\Antioxidantes
- Una vez se encuentra en la carpeta de protocolos buscar PROC-TC-060 Procedimiento ORAC y dar doble clic para iniciar el software.
- Precargar la información de la muestra y las posiciones de la microplaca a usar y dar iniciar para que la temperatura del espectrofotómetro empiece la estabilización a 37°C (Temperatura de incubación).

#### **4.2.3 Verificación del equipamiento.**


Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005.

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.

#### **4.3 Manejo de la muestra.**

Para la ejecución del ensayo, la muestra no requiere condiciones especiales de manejo. La identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, deben

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación</b> <b>Actividad Antioxidante ORAC</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

realizarse de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Sí la muestra es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

NOTA: Evitar exposición directa con la luz por largos tiempos con el objetivo de evitar degradación de los antioxidantes presentes en la muestra

#### **4.4 Medidas de seguridad.**

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar u omitir ningún paso.


Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S.

Es muy importante limpiar los equipos y las superficies en donde se está tratando la muestra para evitar cualquier tipo de contaminación.

#### **4.5 Instrucciones de ensayo.**

##### **4.5.1 Reactivos necesarios**


<b>Reactivo</b>	<b>Pureza</b>
Agua desionizada / Tipo 1	Destilador de Agua 077

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación</b> <b>Actividad Antioxidante ORAC</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

Fluoresceína de Sodio (FL).	Grado reactivo, mínimo 92,9% de contenido del colorante.
Fosfato de Potasio dibásico (anhidro) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,	Pureza 90-99%
Fosfato de Potasio monobásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Pureza 90-99%
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2carboxylic acid)	Pureza 97%
AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride)	Pureza 90-99%
Acetona	Grado reactivo ó HPLC
Randomly methylated -cyclodextrin (RMCD)	Grado reactivo

#### 4.5.2 Soluciones

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,75M):** Pesar 102,07 g de Fosfato de potasio monobásico y disolver en aproximadamente 800 mL de agua destilada. Cuantitativamente transferir a un balón volumétrico de 1 L y llevar aforar a la marca. Agitar por 1 hora y filtrar. Almacenar a temperatura ambiente (20-25°C) por 2 meses.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,75M):** Pesar 130,64 g de Fosfato de potasio dibásico y disolver en aproximadamente 800 mL de agua destilada. Cuantitativamente transferir a un balón volumétrico de 1 L y llevar aforar a la marca. Agitar por 1 hora y filtrar. Almacenar a temperatura ambiente (20-25°C) por 2 meses.
- Solución Stock buffer:** Tomar 603 mL de solución KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,75M) y 351 mL de solución K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,75M), mezclar y agitar. Almacenar a temperatura ambiente (20-25°C) por 2 meses.
- Solución buffer de trabajo 75 mM:** A 900 mL de agua destilada adicionar 100 mL de solución stock buffer. Agitar y verificar que el pH este entre 7,0 y 7,4. Almacenar a temperatura ambiente (20-25°C) por 1 mes.  
Nota: Este buffer solo es para realizar diluciones en el ORAC hidrofílico.
- Solución buffer para ORAC Lipofílico (1,4% RMCD):** Pesar 7,000 g de RMCD (volátil) en un beacker, adicionar lentamente 500mL de solución buffer de trabajo 75 mM. Almacenar a temperatura ambiente (20-25°C) por 1 mes.
- Solución de AAPH:** Pesar 0,2070g en un balón volumétrico de 5 mL, aforar con solución buffer de trabajo 75 mM. **Preparar antes de cada análisis o antes de su uso.**

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

**La solución puede refrigerarse a 2-8°C, siempre y cuando sea preparada 1-2 horas antes de su adición.**

- **Fluoresceína concentrada ( $1.14 \times 10^{-3} \text{ M}$ ):** Pesar 0,021 g de FL y transferir a un balón volumétrico de 50 mL y aforar con solución buffer de trabajo 75mM. Almacenar en congelación en tubos para microcentrífuga plásticos de 1,5mL y protegidos de la luz. Estables por 3 años.
- **Solución stock de fluoresceína (5,70  $\mu\text{M}$ ):** En un tubo cónico de 50 mL adicionar 20 mL de solución buffer de trabajo 75 mM, remover 0,1 mL del buffer y adicionar 0,1 mL de Fluoresceína concentrada. Envolver en aluminio y almacenar entre 2-8 °C. Estable por 1 mes, sin embargo, es preferible prepararla al momento del análisis.
- **Solución de trabajo de fluoresceína (8,265x10<sup>-3</sup>  $\mu\text{M}$ ):** Tomar 200 mL de la solución buffer de trabajo 75 mM. Con una pipeta tomar 290  $\mu\text{L}$  del buffer, descartar y adicionarle 290  $\mu\text{L}$  de Fluoresceína solución stock 5,70  $\mu\text{M}$ . Cubrir con aluminio. Preparar antes de realizar el análisis.
- **Solución de extracción ORAC Hidrofílico (Acetona: Agua 1:1):** Medir 500 mL de acetona y aforar a 1L con agua destilada. Almacenar en frasco ámbar. Estable por 2 meses a 20-25°C.
- **Solución de extracción ORAC lipofílico (Acetona grado reactivo):** Trabajar en campana de extracción.

#### 4.5.3 Estándares y adicionados

- **Solución adicionados para ORAC hidrofílico (10000 $\mu\text{M}$ ):** Pesar 0,125g de trolox y aforar a 50 mL con solución Acetona-agua (1:1). Almacenar de 20-25°C durante máximo 20 días después de la preparación.
- **Solución estándar para ORAC hidrofílico (1000 $\mu\text{M}$ ):** Pesar 0,025g de trolox y aforar a 100 mL con solución buffer de trabajo 75 mM. Almacenar de 2-8°C durante máximo 20 días después de la preparación.
- **Solución estándar de trabajo para ORAC hidrofílico (100 $\mu\text{M}$ ):** En un balón volumétrico de 100 mL adicionar 10 mL de la solución estándar para ORAC hidrofílico 1000  $\mu\text{M}$  y aforar con la solución buffer de trabajo 75 mM. Preparar en el momento de realización del ensayo, no almacenar.
- **Solución adicionados para ORAC lipofílico (10000 $\mu\text{M}$ ):** Pesar 0,125g de trolox en un balón volumétrico de 50 mL con acetona grado reactivo. Almacenar de 20-25°C durante máximo 20 días después de la preparación.
- **Solución estándar para ORAC lipofílico (1000 $\mu\text{M}$ ):** Pesar 0,025g de trolox en un balón volumétrico de 100 mL con solución buffer de ORAC lipofílico (1,4% RMCD).

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión:</b> 6
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

- **Solución estándar para ORAC lipofílico (100µM):** En un balón volumétrico de 100 mL adicionar 10 mL de la solución estándar para ORAC lipofílico 1000 µM y aforar con la solución buffer de trabajo para ORAC lipofílico (1,4% RMCD). Preparar en el momento de realización del ensayo, no almacenar.

**NOTA:** La preparación de estas soluciones debe registrarse en el formato FOR-TC-045, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-057

#### 4.5.4 Preparación de la muestra

##### 4.5.4.1 Preparación de la muestra para ORAC Hidrofílico

Componentes puros pueden ser disueltos directamente en acetona-agua (50+50) v/v y realizar diluciones con Solución buffer de trabajo 75 mM pH 7.4.

Ingredientes botánicos son inicialmente molidos hasta obtener un polvo fino.

Luego pesar 0,5000 g de la muestra homogenizada y adicionar 20 mL de acetona-agua (50+50) v/v, la mezcla es agitada en vortex por durante 5 min.

El extracto es centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, realizar diluciones del sobrenadante con la solución buffer.

##### 4.5.4.2 Preparación de la muestra para ORAC Lipofílico

Pesar 0,5000 g de la muestra y disolver en 20 mL de acetona, agitar la mezcla en vortex por durante 5 minutos.

El extracto es centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, realizar diluciones del sobrenadante con la solución buffer.

La solución de la muestra está lista para analizar después de una debida dilución con solución buffer para ORAC Lipofílico (1,4% RMCD).


#### 4.5.5 Procedimiento de ensayo

Los medios de ensayo, tanto hidrofílicos como lipofílicos, deben ser analizados de manera independiente. Para cada lectura de la placa, es esencial considerar los controles blancos y los estándares. Esto permite que el software Gen5 realice el cálculo preciso del área bajo la curva neta (NET AUC).

##### 4.5.5.1 Preparación de curva de calibración

A partir de la Solución estándar de trabajo para ORAC hidrofílico (100µM) realizar las siguientes diluciones para el medio hidrofílico:

Concentración de trolox (µM)	Estándar 100µM	Buffer de trabajo 75mM (Hidrofílico)
---------------------------------	----------------	---

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

10	100µl	900µl
20	200µl	800µl
30	300µl	700µl
50	500µl	500µl
80	800µl	200µl
100	1000µl	0µl

A partir de la Solución estándar de trabajo para ORAC lipofílico (100µM) realizar las siguientes diluciones para el medio lipofílico:

Concentración de trolox (µM)	Estándar 100µM	Buffer de trabajo 1,4% RMCD (Lipofílico)
10	100µl	900µl
20	200µl	800µl
30	300µl	700µl
50	500µl	500µl
80	800µl	200µl
100	1000µl	0µl

#### 4.5.5.2 Preparación de análisis (Incubación y lectura)

- Adicionar 150µL solución de trabajo de fluoresceína (8,265x10<sup>-3</sup> µM) a cada pozo donde se va a sembrar los estándares, muestras y blanco a analizar, **cada una servida por triplicado, como muestra la gráfica:**

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo Determinación</b> <b>Actividad Antioxidante ORAC</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>									<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>		
										<b>Revisión: 6</b>		
										<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	BLK	SPL2	SPL2	SPL2	SPL10	SPL10	SPL10	SPL18	SPL18	SPL18
B	STD1 10	STD1 10	STD1 10	SPL3	SPL3	SPL3	SPL11	SPL11	SPL11	SPL19	SPL19	SPL19
C	STD2 20	STD2 20	STD2 20	SPL4	SPL4	SPL4	SPL12	SPL12	SPL12	SPL20	SPL20	SPL20
D	STD3 30	STD3 30	STD3 30	SPL5	SPL5	SPL5	SPL13	SPL13	SPL13	SPL21	SPL21	SPL21
E	STD4 50	STD4 50	STD4 50	SPL6	SPL6	SPL6	SPL14	SPL14	SPL14	SPL22	SPL22	SPL22
F	STD5 80	STD5 80	STD5 80	SPL7	SPL7	SPL7	SPL15	SPL15	SPL15	SPL23	SPL23	SPL23
G	STD6 100	STD6 100	STD6 100	SPL8	SPL8	SPL8	SPL16	SPL16	SPL16	SPL24	SPL24	SPL24
H	SPL1	SPL1	SPL1	SPL9	SPL9	SPL9	SPL17	SPL17	SPL17	SPL25	SPL25	SPL25

- Adicionar 25µL de cada estándar, muestra y blanco (buffer de trabajo) en cada uno de los pozos que contiene la solución de trabajo de fluoresceína.
- Incubar durante 30 minutos en el Espectrofluorímetro previamente encendido y estabilizado a 37°C ±1°C.
- Después de pasado el tiempo de incubación, adicionar 25 µL de solución AAPH previamente preparada a cada pozo en el menor tiempo posible.
- Inmediatamente iniciar la lectura de la microplaca en el Espectrofluorímetro debido a que la reacción inicia cuando se adiciona el AAPH.
- Realizar la lectura de la fluorescencia cada minuto durante 1 hora en el Espectrofluorímetro. Las lecturas de fluorescencia están referidas a la lectura más alta de los pozos en los que no se agrega AAPH.

Tener en cuenta que mientras se realiza la incubación y lectura no se pueden leer otros análisis en el equipo.

Una vez realizada la lectura guardar los resultados de la siguiente forma:

ESAA060MMDDLN°\_\_

Indicando respectivamente **ES: Espectrofluorímetro, AA: Año de análisis, 060: Numero de procedimiento, MM: Mes del análisis, DD: Día del análisis, L: Lote N°: Número de lote**

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

#### 4.6 Informe de resultados

Los resultados se registran y calculan de la siguiente manera:

- **Registro de datos primarios**

Los datos primarios serán registrados en el formato FOR-TC- 051 “Formato para el registro de datos primarios del ensayo de ORAC”

- **Cálculos**

Los cálculos son realizados en el SOFT-TC-029 que se encuentra en la siguiente ruta (respectiva de cada año):

L:\LABORATORIO\2025\REGISTROS                      RG-RT\Cuadros                      de                      mando  
2025\ANTIOXIDANTES\ORAC

El cálculo del área bajo la curva (NET AUC) y la verificación del R<sup>2</sup> de la curva de calibración se determina directamente en el software GEN 5.

##### 4.6.1 Cálculos


El área neta bajo la curva (NET AUC) de los estándares y muestras es calculado directamente en el software GEN5. La curva estándar es obtenida al graficar las concentraciones de Trolox contra el promedio de las áreas netas bajo la curva (NET AUC) de dos mediciones para cada concentración. El valor ORAC final es calculado usando la ecuación de regresión entre la concentración de trolox y el área neta bajo la curva y son expresados como micromoles equivalentes de Trolox por litro para muestras líquidas o por gramo para muestras sólidas. El área bajo la curva (NET AUC) es calculada así:

$$AUC = 0.5 + \frac{f_1}{f_0} + \dots + \frac{f_i}{f_0} + \frac{f_{34}}{f_0} + 0.5 x \left( \frac{f_{35}}{f_0} \right)$$

Donde f<sub>0</sub>= fluorescencia inicial leída en el tiempo 0 min; f<sub>i</sub>= florescencia en el tiempo 1.

Los datos del área NET AUC son suministrados por el software GEN5 aplicando la ecuación antes descrita. El área NET AUC es obtenida substrayendo el área NET AUC de los blancos del área NET AUC de las muestras. El valor ORAC relativo a equivalentes trolox es calculado así:

$$ORAC \text{ Value} = \left[ \frac{(AUC_{Sample} - AUC_{blanco})}{(AUC_{Trolox} - AUC_{blanco})} \right] x \frac{(Molaridad \text{ del trolox})}{(Molaridad \text{ de la muestra})}$$

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación</b> <b>Actividad Antioxidante ORAC</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

Los reportes generados por el Espectrofluorímetro son guardados en una carpeta que tiene la siguiente ruta respectiva de cada año:

L:\LABORATORIO\2025\REGISTROS RG-RT\Cuadros de mando 2025  
 \ANTIOXIDANTES\ORAC\Registros Gen5


Los resultados se presentan conforme el formato FOR-TC-011 "Formato de informe de ensayo".

Se aplican los siguientes criterios de cumplimiento, CUMPLE / NO CUMPLE basados en la normativa vigente para cada matriz de alimento (si aplica), de acuerdo con el respaldo técnico dado por las NTC vigentes, Codex Alimentario, Resoluciones INVIMA vigentes.

#### 4.7 Control de calidad


El tipo, periodicidad y criterios de aceptación para los resultados obtenidos de los ensayos para el control de calidad se resumen en la tabla siguiente:

CONTROL	PERIODICIDAD	CRITERIO
Duplicado por matriz	Por lote de análisis	El coeficiente de variación obtenido debe ser menor o igual al $\pm 15\%$
Blanco	Por lote de análisis	Menor o igual a la mitad del límite de cuantificación.
Adicionados	Por lote de análisis	En medio hidrofílico R. % 91% - 107% En medio lipofílico R. % 90% - 115%
Verificación de la curva de calibración	Siempre que se realice la calibración	Interpolar las NET AUC obtenidas para cada uno de los estándares de calibración en el modelo de ajuste por regresión lineal. El coeficiente de determinación no debe ser menor al 0,995. ( $R^2 \geq 0,995$ )
Material de referencia certificado MRC	Mensual	El resultado del ensayo debe estar en el intervalo de valores establecidos como aceptables en el certificado del material
Comparación con laboratorios externos (Rotación de matriz) *	Semestral	La diferencia relativa porcentual no debe superar el 15%.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

Para el aseguramiento de la calidad se empleará material de referencia certificado, en el caso en el cual se encuentre disponible en el mercado.

El seguimiento de los resultados obtenidos del control de calidad listado en la tabla control debe realizarse y analizarse mediante el uso de cartas control, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-077.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

## 5. RESPONSABILIDADES.

### 5.1 Director técnico.


- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

### 5.2 Director de calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

### 5.3 Líder de laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

	<b>Procedimiento de ensayo Determinación Actividad Antioxidante ORAC</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-060</b>
		<b>Revisión: 6</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-03-30</b>

#### 5.4 Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.

#### 6. FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-029 "Cuadro de mando para el ensayo ORAC"

FOR-TC-017 Formato para el control de uso de equipos.

FOR-TC- 051 Registro de datos primarios del ensayo de ORAC

#### 7. ANEXOS.

No aplica