



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DPPH• EN MEZCLAS
ETANOL-AGUA.**

Tesis que presenta
Gloria Alejandra Méndez Rivera
Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Química)

Asesora: Dra. María Teresa Ramírez Silva

Jurado calificador:

Presidente: Dr. Alberto Rojas Hernández

Secretario: Dr. Pedro Ibarra Escutia

Vocal: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

México, D.F. Diciembre 2016



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría con número de becario **285969**.

También agradezco al CONACyT por el apoyo al proyecto con número **237327** y la cátedra con número **2159**.

Agradezco a mis sinodales: el Dr. Alberto Rojas Hernández, el Dr. Carlos Andrés Galán Vidal y el Dr. Pedro Ibarra Escutia por haber revisado mi tesis y las aportaciones hechas al trabajo para su mejora.

También agradezco a la Dra. María Teresa Ramírez Silva por haber dirigido esta tesis además de su guía durante la maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por ser mi segunda casa de estudios y brindarme la oportunidad de cursar la maestría en esta "casa abierta al tiempo".

Al laboratorio de Química Analítica donde se desarrolló este trabajo.

DEDICATORIAS

A la persona más importante en mi vida, Gloria Méndez Rivera, mi mamá. Mami no solo me has dado la vida, sino también todo tu amor y dedicación, sin ti no sería quien soy ni hubiera llegado hasta donde me encuentro ahora. Te quiero mucho, lo sabes y para ti dedico este trabajo, un gran logro que no habría sido posible sin ti.

A mi familia. Bety, América, Toño, Daniel, Ana, Alejandra, los pequeños: Luisito, Daniela, Fabi y Yami; a mi mamá Chapa que, aunque ya no estés con nosotros siempre estarás en mi corazón. No pueden faltar mis pequeños mininos: Kyra, Sammy, Luna y al amor chiquito de Figui (que me cuidas desde el cielo gatuno), sé que sin ellos la vida no sería tan alegre.

A mis entrañables amigos potosinos: Tony, Miriam, Aleida, Tere, Susy, Itzel y Adolfo. Gracias por su cariño, sus palabras de apoyo y los buenos momentos a su lado, los quiero y siempre están presentes en mi corazón. Y que continúen muchas aventuras más a su lado.

Aleida y Tere, sé que ustedes ahora están aquí y no saben la infinita alegría que me da. Espero sigamos descubriendo esta hermosa ciudad juntas.

A mis queridas químicas: Alejandra, Estela, Vicky, Marlenne, Sarahí y Elsie. La UASLP nunca hubiera sido tan genial sin ustedes.

A esos amigos que me trajo la UAM: Azu, Julio V., Julio A., Reyna, Isaac, Panchote, Karina, Marlenne, Dafne, Gracias a todos por su apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

Néstor, gracias por tu amistad y esas palabras de aliento para llegar a mi meta (aunque me regañas mucho).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

A todos los integrantes del laboratorio de química analítica, compañeros del camino y en el trabajo. La senda nunca ha sido sencilla, pero es la que nos lleva a nuestros sueños.

Dra. Tere, sin usted nunca hubiera logrado este trabajo, no solo fue un apoyo en lo académico sino también en lo personal. Gracias por la paciencia, por los ánimos, por creer en mí aun cuando yo no lo podía hacer y por no dejar que me diera por vencida.

Finalmente, gracias Dios. Nuestra relación no ha sido la mejor, pero sé que has puesto a todas estas maravillosas personas en mi vida. Sé que los retos y obstáculos eran necesarios para que yo valorara lo importante

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO 1.....	6
ANTECEDENTES	7
RADICALES LIBRES.....	7
ANTIOXIDANTES.....	8
MÉTODOS PARA DETERMINAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	10
CAPÍTULO 2.....	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
CAPÍTULO 3.....	17
CARACTERIZACIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRACILO (DPPH*)	18
ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL RADICAL DPPH*EN ETANOL Y AGUA.....	20
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	20
RESULTADOS.....	21
ESTABILIDAD DEL DPPH* EN MEZCLAS ETANOL – AGUA	27
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
RESULTADOS.....	28
CAPÍTULO 4.....	35



ESTUDIO DE LA REACCIÓN DEL TROLOX CON EL RADICAL DPPH• EN MEZCLAS ETANOL-AGUA.	36
TROLOX	36
ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REACCIÓN DE tTROLOX CON EL RADICAL DPPH•	39
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	40
RESULTADOS.....	41
ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL DPPH• REDUCIDO EN FUNCIÓN DEL pH	49
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	49
RESULTADOS.....	50
COMPARACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A TROLOX CON EL RADICAL DPPH• EN ETANOL Y EN MEZCLA DE ETANOL-AMORTIGUADOR DE acetatos. ..	55
CAPÍTULO 5.....	57
ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL RADICAL DPPH• CON UN ELECTRODO DE TRABAJO DE PASTA DE CARBONO.	58
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	59
RESULTADOS	60
ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL RADICAL DPPH• CON UN ELECTRODO DE TRABAJO DE COMPOSITE	62
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	62
RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 7.	63
RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE ACETATOS pH 5	66
ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA REACCIÓN ENTRE TROLOX Y EL RADICAL DPPH•.....	69



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	69
RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 7	70
RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE ACETATOS pH 5	72
CAPÍTULO 6.....	74
CONCLUSIONES GENERALES	75
ANEXO 1: EQUIPO Y REACTIVOS	77
REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	77
EQUIPOS DE TRABAJO.....	78
ANEXO 2: Técnica de Voltamperometría Diferencial de Pulso	79
REFERENCIAS.....	80

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABTS	2,2' ácido azino bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
AAc	Amortiguador de acetatos
AE	Cociente de eficiencia antioxidante
AF	Amortiguador de fosfatos
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DPPH-H	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
EC	Electrodo de composite
EC ₅₀	Eficiencia antioxidante.
EPC	Electrodo de pasta de carbono
EtOH	Etanol
FC	Folin-Ciocalteu
n	Número de moléculas de DPPH• que reaccionan con un antioxidante
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TEC ₅₀	Tiempo de eficiencia antioxidante
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchromanol-2-carboxílico
VC	Voltamperometría Cíclica
VDP	Voltamperometría diferencial de pulso
[DPPH•]	Concentración de DPPH•
[Trolox]	Concentración de Trolox
λ	Longitud de Onda
Tris	Tris-(Hidroximetil)aminoetano

RESUMEN

En este trabajo se evalúan las diferentes condiciones para la determinación de la capacidad antioxidante de Trolox en mezclas de etanol-agua con el radical DPPH•.

Para lograrlo se estudia de forma espectrofotométrica la estabilidad del radical DPPH• en diferentes mezclas de etanol-agua e imponiendo diferentes valores de pH. Se encuentra que las mezclas en donde el radical tiene mejor estabilidad son las que van de 90 a 50 % (v/v) de contenido de etanol.

Después se prosiguió a estudiar espectrofotométricamente la reacción entre el DPPH• y el Trolox en las mezclas de 80 a 50% de etanol-agua. Se impusieron tres diferentes valores de pH 5, 7 y 8, con amortiguador de acetatos, fosfatos e hidroximetil(aminoetano) (Tris) respectivamente. Se obtiene una curva de calibración para cada sistema y se compara la sensibilidad y el coeficiente de relación lineal (r^2) de cada uno. Las condiciones en que se lleva mejor la reacción de Trolox y DPPH• es cuando se tiene una mezcla de 50:50 etanol:amortiguador de acetatos pH 5 con un valor de r^2 igual a 0.9966 y una sensibilidad de $0.0227 \mu\text{M}^{-1}$.

Con la técnica de voltamperometría cíclica (VC) se estudia el comportamiento electroquímico del radical DPPH• en la mezcla de 50:50 de etanol (EtOH) con amortiguador de fosfatos (AF) a pH 7 y con amortiguador de acetatos (AAc) a pH 5. Para hacerlo se usa un electrodo de trabajo de pasta de carbono y otro de composite un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. Se encuentra que en ambos sistemas el DPPH• presenta un par redox semireversible y reproducible.

Se propone implementar un método electroquímico para la determinación de capacidad antioxidante de Trolox por medio del radical DPPH• con la



técnica de voltamperometría diferencial de pulso (VDP) usando un electrodo de trabajo de composite. El radical presenta una respuesta de oxidación que es proporcional con su concentración remanente después de haber reaccionado con el Trolox, lo que permite construir una curva de calibración con una sensibilidad de $21.939 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ y un valor de r^2 de 0.9960 para el sistema con mezcla de etanol y AF 50:50 a pH 7; y para la mezcla de etanol con amortiguador de acetatos (AAc) 50:50 a pH 5 se obtiene una sensibilidad de $42.3 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ y un valor de r^2 de 0.9916.

INTRODUCCIÓN

En la vida diaria ocurren diferentes procesos químicos a nuestro alrededor. Los cuales pueden afectar nuestro entorno tanto de forma positiva como negativa. Uno de estos procesos son las reacciones de oxidación-reducción o redox que se dan por transferencia de electrones. La oxidación ocurre cuando un elemento pierde electrones que son cedidos a otro elemento; y cuando el otro elemento gana estos electrones sucede la reducción.

Cuando en los alimentos ocurren reacciones de oxidación se pueden propiciar cambios en el sabor, apariencia, toxicidad y pérdida del valor nutricional. Estos cambios ocurren por la oxidación de lípidos debido a una reacción en cadena producida por radicales libres [1].

El estrés oxidativo y nitrosativo se presenta cuando hay concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente por sus acrónimos en inglés), las cuales son responsables de múltiples reacciones de oxidación que conducen a procesos como la degradación del ADN y la desnaturalización de proteínas. Debido a esto, el estrés oxidativo se ha asociado con el proceso de envejecimiento y diversos padecimientos como: enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y desórdenes neurológicos [2, 3].

Es por esto que los antioxidantes, que pueden ser sustancias naturales o sintéticas, son de gran importancia ya que pueden impedir o prevenir que las reacciones por radicales libres se lleven a cabo tanto dentro de los alimentos o el metabolismo celular [4]. Su consumo es muy importante ya que se debe mantener un balance adecuado de radicales libres en el organismo. Por esto se ha buscado el mejor método para determinar la capacidad antioxidante de varias sustancias presentes en diferentes alimentos como frutas, verduras, vinos, té y algunas plantas [5-9].



La capacidad antioxidante es la habilidad que tiene una sustancia para inhibir una reacción de oxidación en un sistema [10]. Los antioxidantes pueden ser lipofílicos o hidrofílicos por lo que, para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia existen diferentes metodologías que se adaptan a la naturaleza de la sustancia, algunas de ellas son: la determinación por medio de biosensores [11], el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que se basa en la reducción del Fe(III) por un antioxidante, la capacidad de reducción del ion Cu(II), el método Folin-Ciocalteu (FC) para determinar los compuestos fenólicos totales [4], o los métodos de radicales libres como el del radical ABTS (2,2' ácido azino bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) y el radical libre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) [12].

Debido a la diversidad de técnicas y terminologías para reportar capacidad antioxidante se vuelve deseable que con un solo método se puedan analizar diferentes tipos de muestras y obtener resultados comparables entre sí. El método de determinación de capacidad antioxidante por el radical DPPH• ha cobrado una gran relevancia usándose ampliamente debido a la sencillez del método.

Por lo que se propone optimizar el método espectrofotométrico de determinación de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) con el radical DPPH• en diferentes mezclas etanol-agua.

Además, se propone un método electroquímico de determinación de capacidad antioxidante equivalente a Trolox con el radical DPPH• con las condiciones idóneas encontradas con el método espectrofotométrico.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

RADICALES LIBRES

Un radical libre puede ser un átomo, molécula o complejo que tenga uno o más electrones desapareados en su estructura. [13]

Un radical libre se puede obtener de distintas formas. Los radicales más reactivos se pueden obtener por descomposición térmica, técnicas de irradiación (usando radiación de luz ultravioleta, microondas, rayos X, electrones, partículas alfa, neutrones o rayos gamma, etc.). [14]

Se sabe que los radicales libres poco estables tienen una vida media ($t_{1/2}$) menor a los 10^{-3} s [15]. Sin embargo, el concepto de estabilidad no solo recae en el concepto del tiempo, ya que dependiendo de su ambiente químico un radical puede tener una vida media de minutos, horas, días o hasta meses. Por lo que un radical estable se puede definir como: "Un radical que se puede preparar por métodos químicos convencionales y existirá lo suficiente para utilizarlo en posteriores reacciones químicas, o ser examinado por métodos espectroscópicos tradicionales." [13]

Existen diferentes factores que afectan en la estabilidad de un radical, entre ellos:

- La energía de ruptura de enlace. Si se tiene una reacción del tipo:



Y tiene valor de ΔH pequeño, el equilibrio se desplazaría a la izquierda y el radical se estabilizaría por dimerización. [13]

- Las estructuras mesoméricas o resonantes. Éstas se usan para describir la deslocalización de un electrón en una molécula. Al aumentar las posibilidades de deslocalización del electrón



desapareado, aumentan las estructuras mesoméricas y la energía de resonancia. También disminuye la densidad del espín libre sobre el radical distribuyéndola sobre la molécula aumentando la estabilidad del radical. [13, 14]

- Los efectos estéricos. El tamaño y forma de una molécula determinará la fuerza del enlace químico y por lo tanto su estabilidad. [13]

ANTIOXIDANTES

En los últimos tiempos los antioxidantes han cobrado una gran importancia y para entender el porqué, se debe saber qué es un antioxidante. En la literatura podemos encontrar diferentes definiciones. En el diccionario podemos encontrar la definición de antioxidante como: "Una sustancia que se opone a la oxidación o inhibe las reacciones promovidas por oxígeno o peróxidos, muchas de estas sustancias son usadas como preservativos en diferentes productos (como en grasas, aceites, jabones, en alimentos para evitar que se vuelvan rancios, en la gasolina y otros derivados del petróleo para evitar que se vuelvan viscosos y otros cambios indeseados, y en el caucho para evitar su degradación." [16] Esta definición es muy amplia y general, además que abarca los diferentes usos que se le dan a los antioxidantes en la industria. Otra definición general de antioxidante es: "Los antioxidantes son compuestos orgánicos capaces de neutralizar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estos compuestos pueden donar un electrón para neutralizar un radical libre." [17] Aquí se explica químicamente su



funcionamiento, sin embargo, los antioxidantes tienen diferentes mecanismos de acción y no es incluyente para todos ellos.

La Academia Nacional de Ciencias definió a los antioxidantes dietéticos como: "Aquellos antioxidantes que se encuentran en la comida y disminuyen significativamente los efectos adversos de las ROS, RNS, o ambas especies en las funciones fisiológicas normales de los humanos." [17]. Con esta definición nos podemos sentir más familiarizados debido al auge comercial de productos de consumo ricos en antioxidantes para mantener una buena salud.

Finalmente, Halliwell define a los antioxidantes como: "Moléculas que cuando están presentes en pequeñas concentraciones, comparadas con las de las biomoléculas que protegen, pueden prevenir o reducir el alcance de la destrucción oxidativa en las moléculas." [18]

Los antioxidantes se pueden clasificar como antioxidantes preventivos, antioxidantes rompedores de cadena o terminadores de reacción y antioxidantes indirectos.

Los antioxidantes preventivos son aquellos que interfieren en el proceso de iniciación de radicales libres; quiere decir que retardan o detienen la formación inicial de las especies radicales. Algunos de ellos pueden ser: la enzima catalasa, compuestos quelantes como el EDTA, y filtros UV como el óxido de zinc o 2-hidroxibenzofenona. [19]

Por otra parte, los antioxidantes indirectos ayudan a aumentar la defensa de los compuestos antioxidantes, reduciendo la generación de especies ROS y disminuyendo el estrés oxidativo. [19]

Finalmente, los antioxidantes rompedores de cadena vuelven más lenta la autooxidación, compitiendo con la propagación de las reacciones de radicales libres. Esto es, los antioxidantes reaccionan con los radicales



peróxidos más rápido que el sustrato oxidable para formar especies que no propaguen la oxidación en cadena.[19]

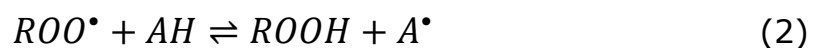
Los fenoles pueden fungir como antioxidantes indirectos al incrementar el efecto antioxidante de las enzimas de la célula. Sin embargo, en mejor conocida su reacción con los radicales peróxidos que son los propagadores de cadena, y eso los convierte en los rompedores de cadena ideales.

MÉTODOS PARA DETERMINAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Al referirnos a capacidad, poder, eficiencia o actividad antioxidante, nos referimos a su "capacidad" de inhibir la reacción de propagación de radicales libres y proteger a las moléculas oxidables del daño de éstos.

Para medir la capacidad antioxidante existen diversos métodos, según las reacciones químicas involucrados en ellos, se dividen en dos grandes grupos: los métodos por transferencia de átomo de hidrógeno (HAT por sus siglas en inglés) y los métodos de transferencia de electrón (ET).

Los métodos de HAT siguen la reacción del tipo:

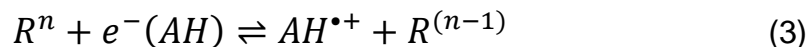


Este tipo de método cuantifica la capacidad del compuesto antioxidante de donar un átomo de hidrogeno. Se monitorean la cinética de reacciones competitivas y la cuantificación se deriva de las curvas cinéticas obtenidas. Los métodos HAT se componen de un generador sintético de radicales libres, una molécula oxidable de prueba y un antioxidante. Un buen antioxidante deberá entonces reaccionar rápidamente con los radicales libres, más no de la misma forma con la molécula de prueba que es la que debe proteger. Dentro de los métodos HAT más usados se encuentra el método ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP



(total radical trapping antioxidant parameter) y la inhibición de oxidación de LDL (lipoproteínas de baja densidad). [20]

Por otra parte, los métodos de ET son aquellos que miden la capacidad de reducción de un antioxidante, y tienen una reacción del tipo:



Los métodos de ET se componen de una molécula de prueba oxidable, que suele ser un estándar colorido, y de un antioxidante. Cuando la molécula de prueba sustrae un electrón del antioxidante, existe un cambio de coloración que es proporcional con la concentración del antioxidante. Graficando el cambio de absorbancia contra la concentración de antioxidante se obtiene una curva de calibración de la cual su pendiente nos indica la capacidad de reducción del antioxidante.

Dentro de los métodos de ET más usados se encuentran: el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que se basa en la reducción del Fe(III), por un antioxidante, la capacidad de reducción del ion Cu(II), el método Folin-Ciocalteu (FC) para determinar los compuestos fenólicos totales [20] o los métodos de radicales libres como el del radical ABTS (2,2' ácido azino bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) [21] o el radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).[22]

Para denominar la capacidad antioxidante existen diferentes formas. Una de ellas es la Eficiencia antioxidante (EC₅₀), que se denomina a la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en 50 % la concentración inicial del radical DPPH[•] introducida así por Brand-Williams [23]. Por lo que a mayor concentración de antioxidante usado es menor la eficiencia antioxidante.



De la mano también se obtiene el parámetro de TEC_{50} que es el tiempo necesario para alcanzar la estabilidad en la reacción cuando se reduce el 50% de la concentración del radical. [24] Además de estos dos parámetros, se puede obtener la Eficiencia Antiradical (AE) que es un parámetro que relaciona la EC_{50} y el TEC_{50} y permite comparar a diferentes antioxidantes tomando en cuenta la cinética de la reacción. La AE se obtiene como el inverso del producto de EC_{50} y de TEC_{50} . [24]

Por otra parte, la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) que es definida como: "la concentración milimolar (mM) de una solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que una solución 1.0 mM de la sustancia de estudio.[25]



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CAPÍTULO 2



HIPÓTESIS

En una mezcla de etanol y solución acuosa el radical DPPH• se puede mantener estable e implementar un método para determinar la capacidad antioxidante de diferentes sustancias.



OBJETIVO GENERAL

Optimizar el método espectroscópico de determinación de capacidad antioxidante equivalente a Trolox con el radical DPPH• en mezclas de etanol y solución acuosa, e implementar un método electroquímico para la determinación de capacidad antioxidante comparándolo con el método espectroscópico.



OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar espectrofotométricamente la estabilidad del DPPH• en mezclas etanol y solución acuosa imponiendo diferentes valores de pH.
2. Estudiar espectrofotométricamente la reacción de Trolox con DPPH• en las mezclas donde el radical haya presentado mayor estabilidad imponiendo diferentes valores de pH.
3. Analizar diferentes antioxidantes y comparar el método de determinación de capacidad antioxidante tradicional con DPPH• con el modificado con las mezclas de etanol y solución acuosa.
4. Estudiar electroquímicamente el radical DPPH• en la mezcla etanol-agua donde encuentre una buena estabilidad y en diferentes pH.
5. Estudiar electroquímicamente la reacción entre DPPH• y Trolox en la mezcla etanol-agua donde el radical presente buena estabilidad y con diferentes valores de pH.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRACILO (DPPH[•])

En la década de 1920 Goldschmith, Renn y colaboradores iniciaron la investigación de los radicales hidracilos. El compuesto más conocido es el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo o también conocido como DPPH[•] (Figura 1) que fue sintetizado en 1922.

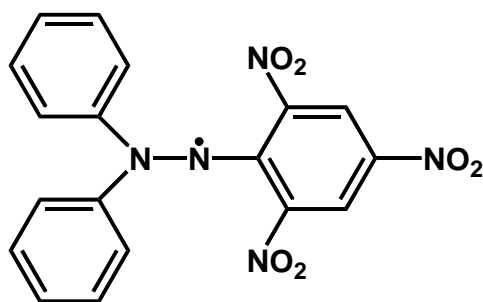


Figura 1. Estructura molecular del radical-2.2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]).

El DPPH[•] tiene la apariencia de cristales color morado oscuro. Este radical es altamente estable, no presenta degradación cuando se encuentra en estado sólido y tiene un fácil uso y manejo a diferencia de otros radicales. Su estabilidad puede ser explicada debido a todas las posibles formas resonantes que puede adoptar el radical. Las más importantes son mostradas en la figura 2. Se ha encontrado que las estructuras resonantes que tienen el electrón desapareado en el primer nitrógeno (el que se encuentra unido con el grupo picril), figura 2a ↔ 2d, son las formas que tienen mayor contribución a la estructura híbrida del radical con un 62%. Las formas 2b ↔ 2e, que tienen en su estructura el electrón desapareado en el segundo nitrógeno (el que se encuentra unido a los

dos grupos fenilo) contribuyen en un 26% a la estructura del radical. Las demás formas existentes ($2b \leftrightarrow 2e$, y otras) solo contribuyen en aproximadamente un 10% a la estructura total del radical. [14]

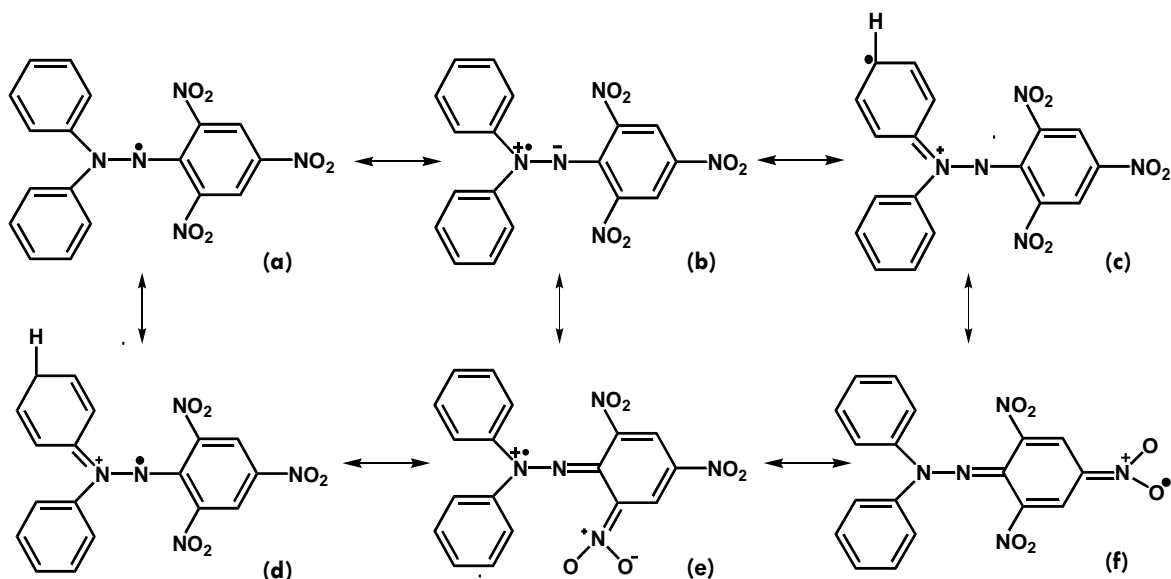


Figura 2 Algunas formas resonantes del radical DPPH•. [14]

Después de su descubrimiento el DPPH• ha tenido diferentes aplicaciones, entre ellas el radical se ha usado como estándar en Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica debido a su electrón desapareado, [26] y en 1958 Blois observó que el radical presenta un espectro de absorción UV-VIS con una definida banda de absorción atribuida a su electrón desapareado en la longitud de onda de 517 nm en etanol. [22] La banda se puede encontrar entre 514 y 520 nm dependiendo del solvente utilizado [27, 28]

El DPPH• solo es estable en solventes orgánicos como metanol [23, 29], etanol [5, 22], benceno, tolueno, cloroformo [30] o dimetilsulfóxido (DMSO) [31] y se debe ser cuidadoso en las condiciones ambientales que se encuentre, ya que se degrada con mayor rapidez por acción de la luz y el oxígeno. [22, 32]



ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL RADICAL DPPH•EN ETANOL Y AGUA.

De acuerdo a lo que se ha las propiedades del DPPH• se inicia el estudio del comportamiento espectrofotométrico del DPPH• en diferentes condiciones.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los reactivos, preparación de soluciones y el equipo utilizado se indican en el Anexo 1.

RESPUESTA ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL RADICAL. DPPH•

Para obtener el espectro de absorción del radical, se toma una alícuota de 0.5 mL la solución madre del radical DPPH• (2 mM), y se diluye con etanol o agua desionizada dependiendo del caso a estudiar, en la celda de cuarzo para tener una concentración final en celda de 100 μ M y se obtiene su espectro de absorción UV-VIS de 800 a 200 nm.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL DPPH•

Para estudiar la estabilidad del radical DPPH• se toma una alícuota de la solución madre del radical y se lleva a un volumen de 10 mL con etanol para tener una concentración final en celda de 100 μ M. Esta solución se monitorea tomando un espectro UV-VIS, en un intervalo de 800 a 200 nm, cada 4 minutos por un lapso de 60 minutos. La temperatura de trabajo es establecida en 15°C con un baño termostatado.

Para el estudio en agua del radical se sigue el mismo procedimiento solo que la dilución del DPPH• se hace con agua desionizada.

RESULTADOS

En la figura 3 se presenta el espectro UV-Vis del radical DPPH• en etanol con una concentración de $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$. El radical presenta tres bandas con absorbancia máxima en las longitudes de onda de 516, 328 y 207 nm, además de un hombro entre 230 y 238 nm.

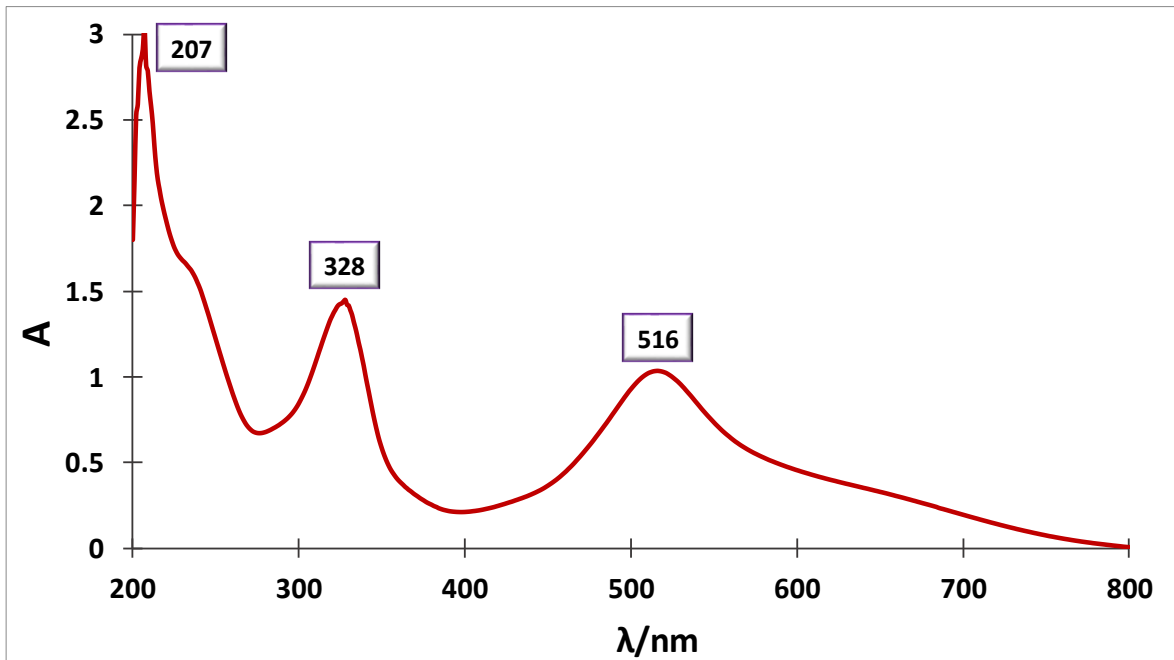


Figura 3. Espectro de absorción del radical DPPH• $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$ en etanol.

En este sistema, con etanol como disolvente, el DPPH• presenta su banda característica en una longitud de onda de 516 nm, esta banda es asociada al electrón desapareado del radical y a una transición de un orbital π a uno π^* . [33] La mayoría de radicales suelen tener una fuerte absorbancia en la zona visible del espectro y por lo tanto suelen presentarse como disoluciones altamente coloridas, esto debido a que el electrón desapareado es excitado con mayor facilidad. [13]

La siguiente banda que aparece en la longitud de en 328 nm que puede atribuirse a los grupos nitróxido en la molécula y la banda en 207 nm se asocia a la absorción por los grupos aromáticos.

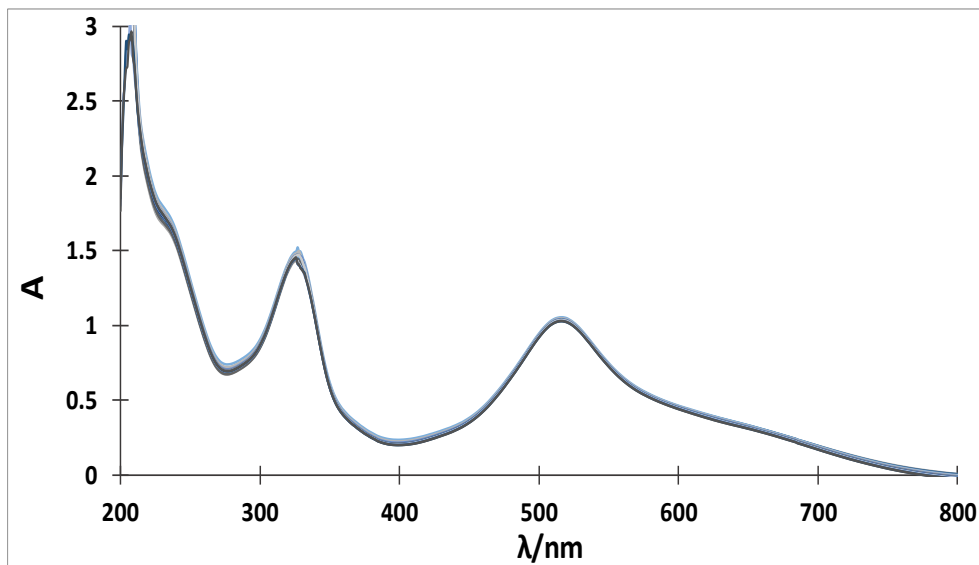


Figura 4. Espectros de absorción del radical DPPH• $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$ en etanol en el transcurso de 60 minutos.

Una vez que se han identificado las bandas principales en el radical, se desea conocer la estabilidad del DPPH• en una solución de etanol en el lapso de una hora. En la figura 4 se muestran los espectros obtenidos para el estudio de estabilidad del radical en etanol con concentración de $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$, en ellos no se observan cambios apreciables. Transcurridos los 60 minutos del experimento se presenta una disminución de absorbancia de 0.262 % en la longitud de onda de 516 nm, lo que se puede considerar una degradación despreciable de DPPH•.

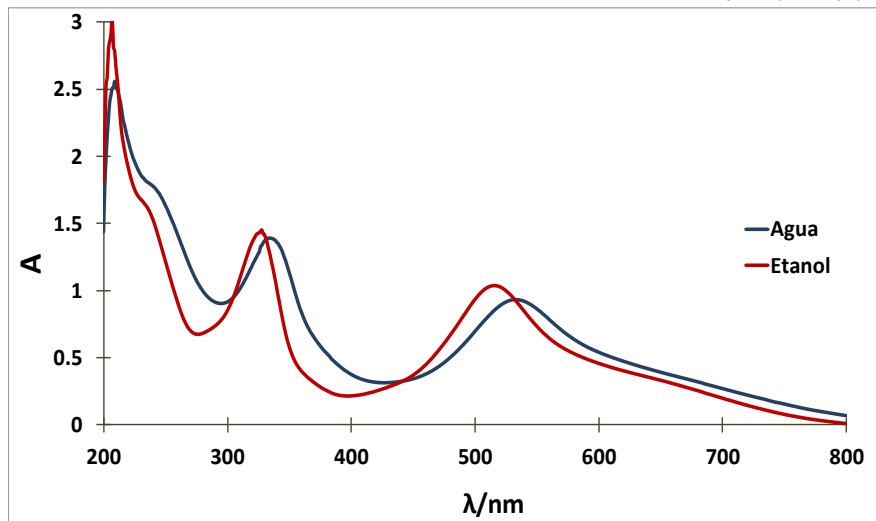


Figura 5. Espectros de absorción del radical DPPH• $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$ en etanol (línea roja) y en agua desionizada (línea azul), en tiempo 0.

En la figura 5 tenemos el espectro del DPPH• en agua desionizada (en color azul) comparado con el espectro del radical en etanol (en color rojo) a tiempo 0. El espectro del radical en agua tiene un efecto batocrómico e hipocrómico con respecto al espectro del radical en etanol. Las tres principales bandas tienen sus máximos de absorción en las longitudes de onda de: 209, 335 y 532 nm, además de un hombro entre 240 y 250 nm. En cuanto el DPPH• entra en contacto con el agua desionizada, éste comienza a degradarse, dando lugar a que disminuya su absorbancia con respecto al radical en etanol.

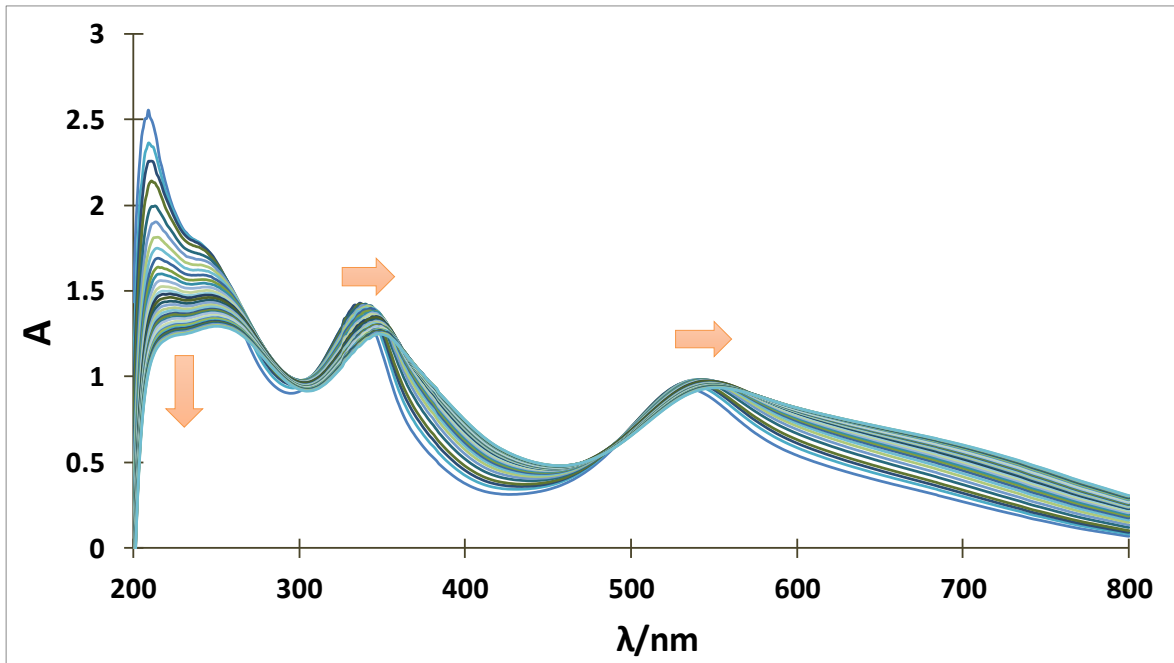


Figura 6. Espectros de absorción del radical DPPH• $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$ en agua desionizada en el transcurso de 60 minutos.

A través de los espectros de absorción del radical DPPH• en agua, con concentración $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$, que se muestran en la figura 6 se muestra que transcurridos los 60 minutos las bandas principales del radical presentan un efecto hipocrómico y batocrómico. El cambio más grande se observa en la banda a 209 nm que comienza a disminuir su absorbancia hasta que el pico prácticamente desaparece y el hombro se define más como una banda con un máximo de 249 nm.

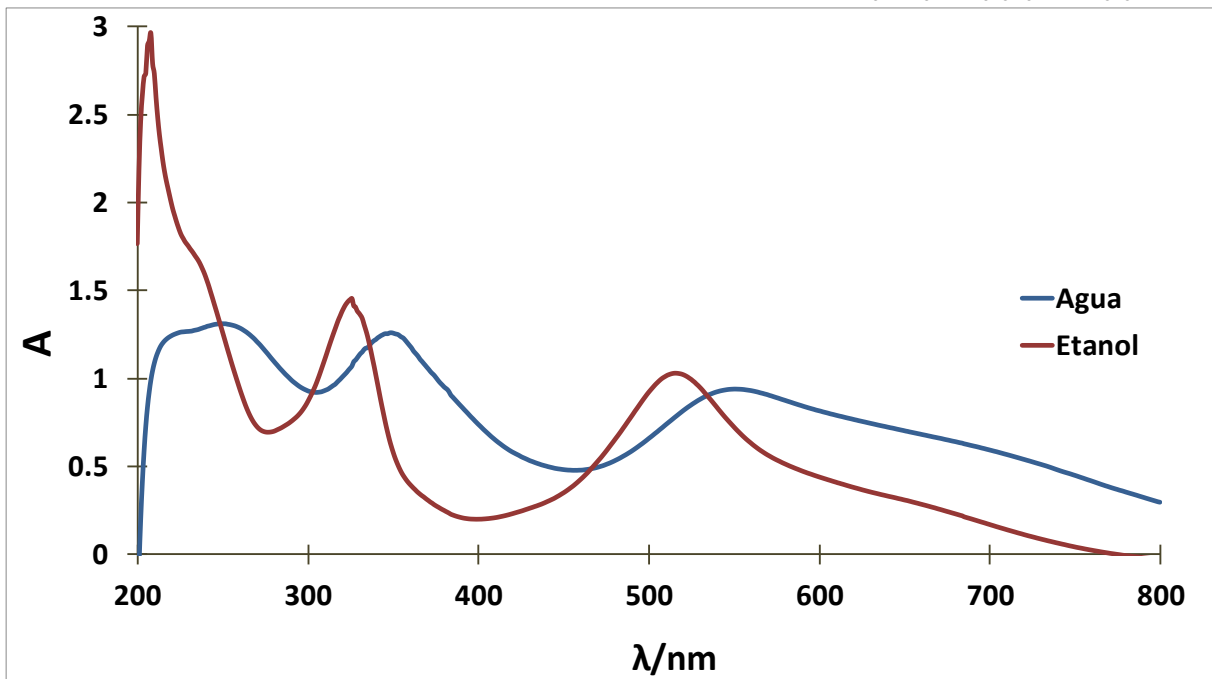


Figura 7. Espectros de absorción del radical DPPH• $98.91 \pm 0.56 \mu\text{M}$ en etanol (línea roja) y en agua desionizada (línea azul), en el minuto 60.

En la figura 7 se compara los espectros de absorción del DPPH• en etanol (línea roja) y en agua (línea azul) cuando ya han transcurrido los 60 minutos del experimento. Ya se ha visto que el radical en etanol no presenta cambios en su espectro después de 60 minutos, sin embargo, el radical en agua sufre una deformación en su espectro. En la primera banda, que aparece en 209 nm en etanol, sufre un efecto hipocrómico y reduce su absorbancia en más del 50 %; además el hombro que aparecen en etanol se perfila más como una banda con un máximo de longitud de onda en 247 nm. La segunda banda a 335 nm, en etanol, tiene un efecto batocrómico desplazando el máximo a una longitud de onda de 347 nm, además de un efecto hipocrómico cuando el radical está en agua. La tercera banda que se presenta en 516 nm en etanol también presenta un desplazamiento batocrómico hasta 550 nm y un efecto hipocrómico. Además comienza a aparecer un hombro entre los 600 y 700 nm. Al



transcurso de los 60 minutos el DPPH• en agua mantiene un espectro similar, esto puede deberse a que el compuesto sigue teniendo los mismos grupos funcionales sin embargo pierde su electrón desapareado. Lo que confirma que el DPPH• no es estable en agua.

La mayoría de las moléculas a las que se mide capacidad antioxidante suelen tener mejor solubilidad en solventes acuosos que en solventes orgánicos. Sin embargo, como se mostró anteriormente el DPPH• pierde algunas de sus características, principalmente su estabilidad, como lo comprueba el espectro de absorción UV/VIS. Debido a esto se decide estudiar el comportamiento del DPPH• en mezclas de etanol y solución acuosa.

ESTABILIDAD DEL DPPH[•] EN MEZCLAS ETANOL – AGUA

Considerando la baja estabilidad en medio acuoso del radical DPPH[•], en el presente trabajo se pretende optimizar la mezcla de solventes en la cual el DPPH[•] no se degrade. Se evaluarán diferentes valores de pH y distintos amortiguadores en mezcla con etanol y en distintas proporciones.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para evaluar la estabilidad del radical DPPH[•] en diferentes mezclas de etanol-solución acuosa, se obtienen los espectros UV-VIS de DPPH[•] en un intervalo de 600 a 200 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 20 UV/Vis, por un tiempo de 60 minutos tomando lecturas cada cuatro minutos. Para preparar cada muestra se toma una alícuota de 0.5 mL de una solución de DPPH[•] con concentración de 2 mM y se lleva a un volumen de 10 mL, para así tener una concentración final en celda de 100 μM. En cada mezcla se varia el contenido de etanol de 90 a 10 % volumen/volumen preparando las disoluciones como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 1. Guía para preparar las mezclas de etanol con solución acuosa.

<i>Vol. Etanol (%)</i>	90	80	70	60	50	40	30	20	10
<i>Vol. DPPH[•]/mL</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Vol. Etanol/mL</i>	8.5	7.5	6.5	5.5	4.5	3.5	2.5	1.5	0.5
<i>Vol. Amortiguador/mL</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9



El estudio es realizado para mezclas de etanol con: agua desionizada, solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 con concentración de 2.012 ± 0.016 mM y solución amortiguadora de acetatos a pH 5.0. con concentración de 5.203 ± 0.231 mM.

RESULTADOS

Radical DPPH[•] en etanol y amortiguador de fosfatos a pH 7

Se hicieron las pruebas de estabilidad del radical DPPH[•] para diferentes mezclas de etanol con solución amortiguadora de fosfatos (2 mM) a pH 7. La imagen 8 muestra los espectros de absorción de las diferentes mezclas al inicio del experimento de estabilidad. La línea negra continua representa el espectro del DPPH[•] en una solución de 100 % etanol y ésta será nuestro estándar para hacer las comparaciones.

Para las mezclas que contienen del 90 al 40 % de etanol se puede ver un efecto hiperocrómico en las bandas en 335 nm y 516 nm; además en esta última también tenemos un efecto batocrómico que desplaza el máximo de longitud de onda a valores de 519 y hasta 535 nm.

Para las mezclas con el 30 al 10 % de etanol se observa un efecto hipocrómico en las tres bandas principales del DPPH[•] y también un efecto batocrómico más grande que para las mezclas que contienen de 40 % de etanol.

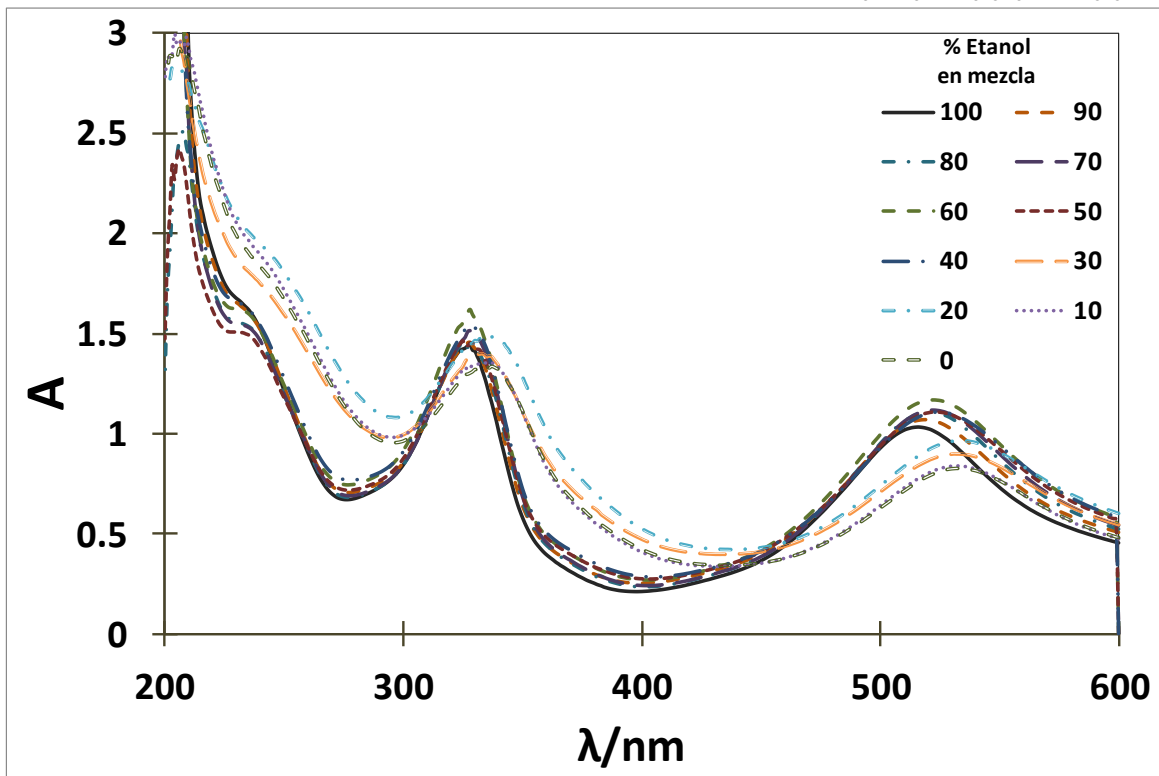


Figura 8. Espectros UV del DPPH• 100 μM en las diferentes mezclas Etanol-Amortiguador de fosfatos (2 mM) pH 7.0 al inicio de la prueba de estabilidad.

De la misma forma se hizo la cinética del DPPH• en diferentes mezclas de etanol con amortiguador de fosfatos pH 7.0. Para todos los sistemas se siguió la absorbancia a 516 nm, que es el máximo observado para el DPPH• en solución etanólica, y se obtuvo su absorbancia relativa. La degradación del DPPH• se presentó en mayor medida, como era esperado, en las mezclas que contenían los menores porcentajes de alcohol, que fueron 30, 20 y 10 %.

Para las mezclas de 40, 50, 60, 70, 80 y 90 % de etanol con el amortiguador de fosfatos se observa que la coloración se intensificaba y producía un efecto hiperacrómico y batocrómico a comparación de la disolución en puro etanol.

En la figura 9 se muestra el comportamiento para las diferentes mezclas de amortiguador de fosfatos y etanol cuando han pasado 60 minutos de la prueba de estabilidad. Las mezclas donde el radical ha presentado el mayor cambio en su espectro UV han sido las que contienen 40, 30, 20 y 10 % de contenido etanólico acentuándose el efecto batocrómico e hipocrómico en las bandas correspondientes a 335 y 516 nm.

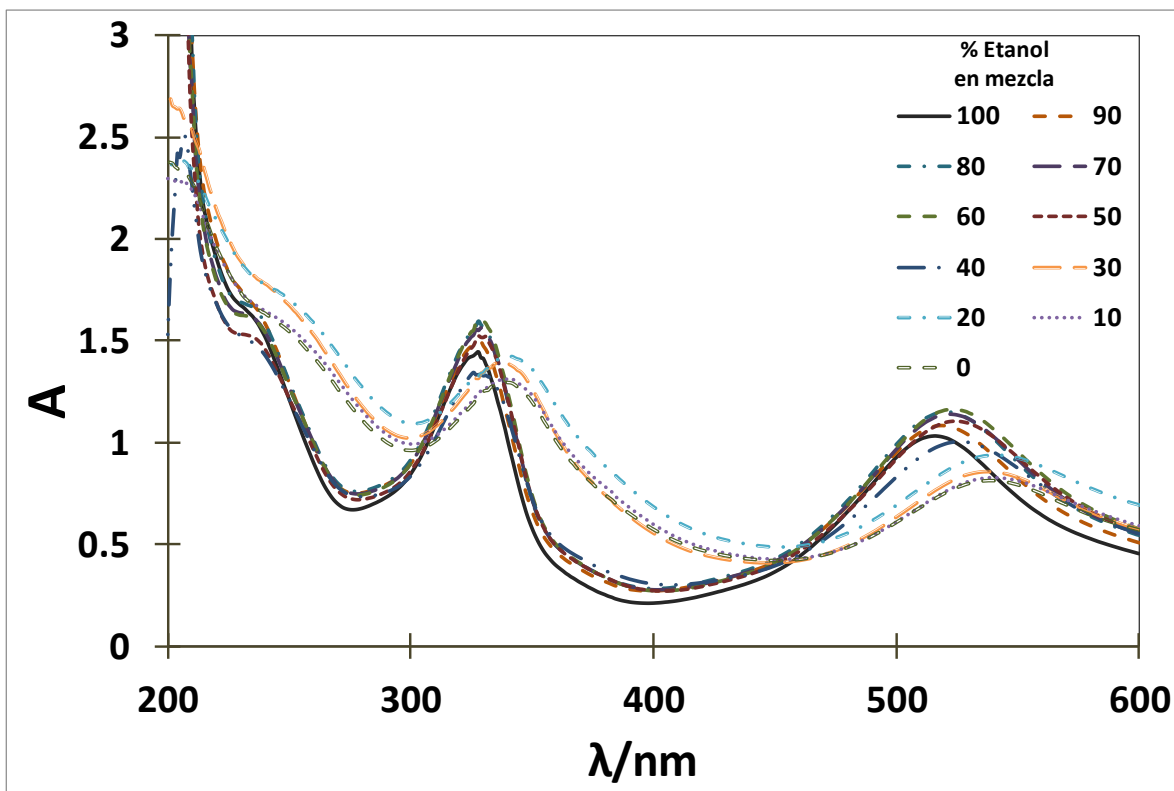


Figura 9. Espectros de DPPH• 100 μ M en las diferentes mezclas Etanol – Amortiguador de fosfatos (2mM) pH 7.0 al término de la prueba de estabilidad.

Radical DPPH[•] en etanol y amortiguador de acetatos pH 5

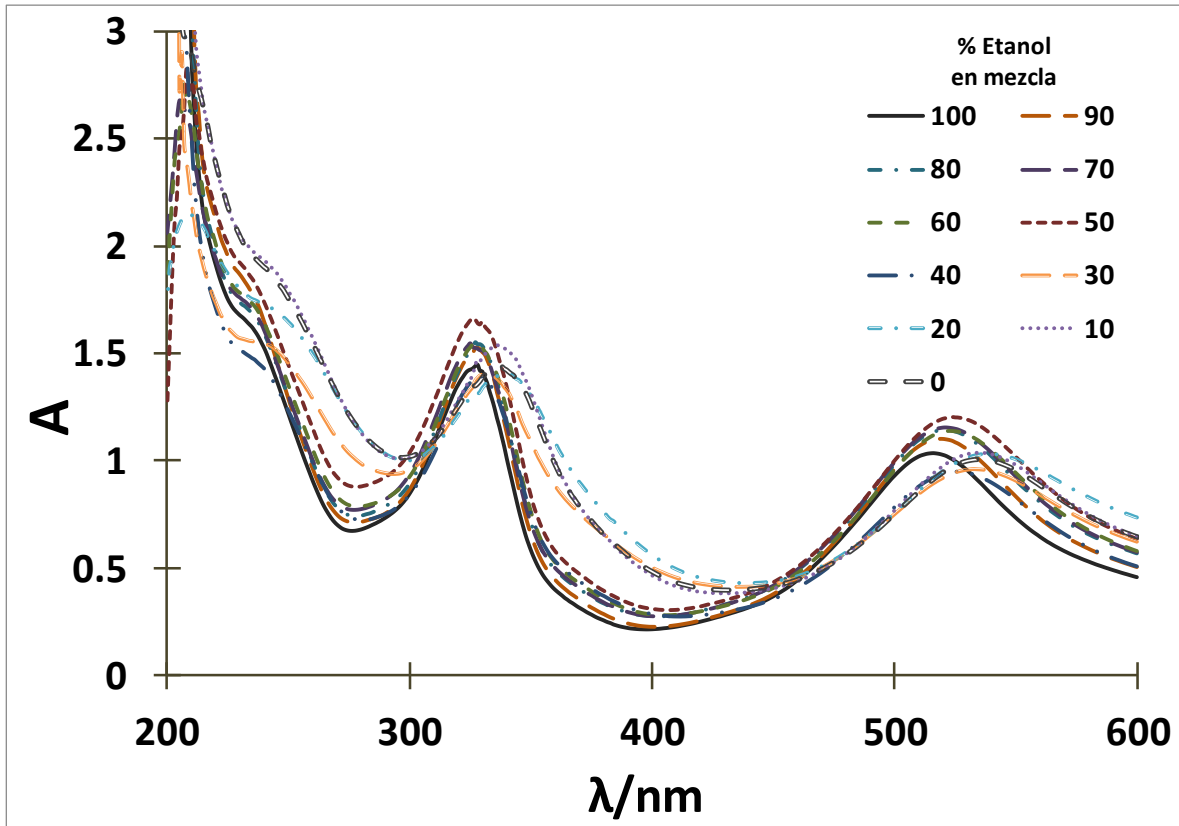


Figura 10. Espectros UV del DPPH[•] 100 μ M en las diferentes mezclas Etanol-Amortiguador de acetatos (5mM) pH 5.0 al inicio de la prueba de estabilidad.

Se hicieron las pruebas de estabilidad del radical DPPH[•] para diferentes mezclas de etanol con solución amortiguadora de acetatos (5mM) a pH 5. La figura 10 muestra los espectros de absorción de las diferentes mezclas al inicio del experimento de estabilidad. Para los espectros del DPPH[•] en las mezclas de 50 o más porcentaje de etanol vemos un efecto hiperocrómico para las tres bandas y un efecto batocrómico para la banda a 516 nm con un desplazamiento similar a los espectros UV en mezclas con amortiguador de fosfatos. Para las mezclas con 40 o menos

porcentaje de etanol en mezcla se observa un efecto batocrómico más marcado para las tres bandas principales.

En la figura 11 se muestran los espectros al final del experimento, en el caso de las mezclas con amortiguador de fosfatos la disminución de la absorbancia a 516 nm después de 1 hora fue menor a diferencia de las mezclas con amortiguadores de fosfatos.

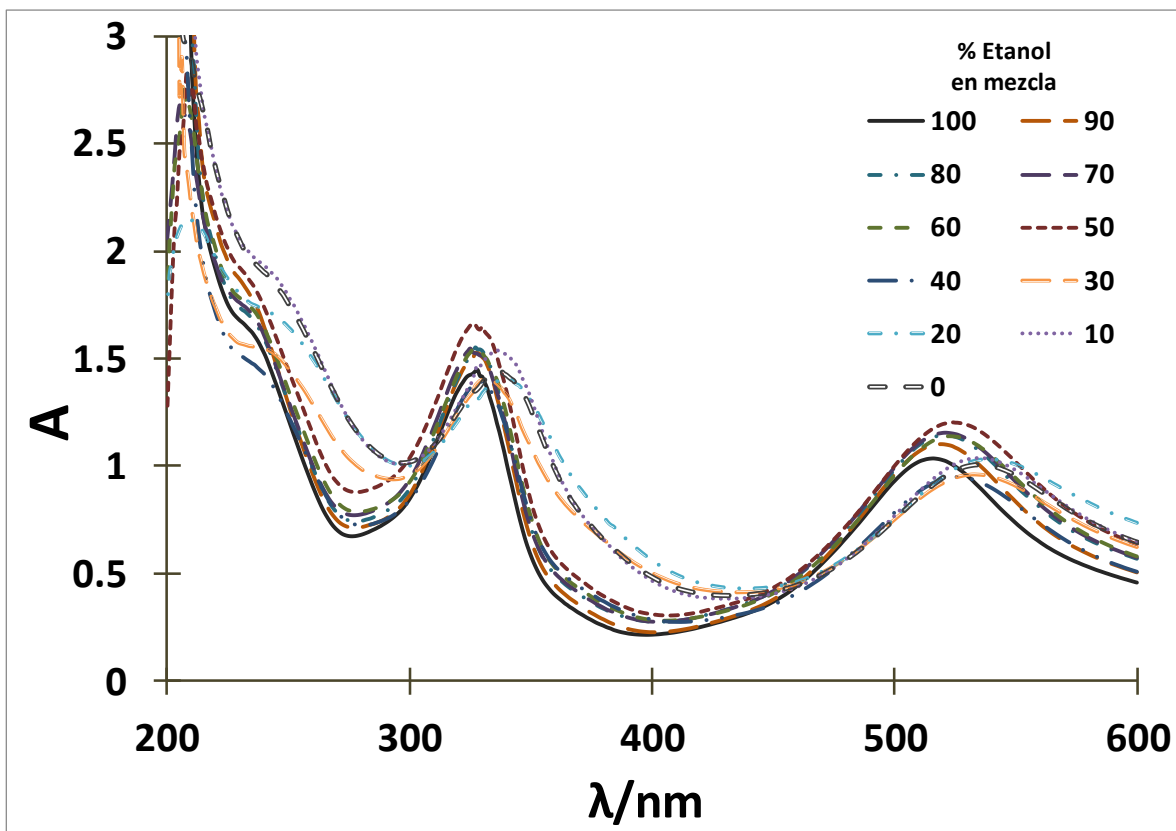


Figura 11. Espectros UV del DPPH• 100 μM en las diferentes mezclas Etanol-Amortiguador de acetatos (5mM) pH 5.0 transcurridos 60 minutos de la prueba de estabilidad.

Para saber si las sales de fosfatos o acetatos cambiaban el comportamiento del radical en las mezclas con solución acuosa, se llevó a cabo el experimento de estabilidad también con agua desionizada. En la figura 12 se puede resaltar que el efecto hipercrómico presentado en

las mezclas con los amortiguadores no se presenta en agua desionizada, por lo que se puede suponer que las sales incrementan la intensidad de absorbancia del DPPH[•]. Sin embargo, el efecto batocrómico se conserva en forma similar a las mezclas anteriores e igualmente las mezclas que presentan mayor degradación son las que tienen un porcentaje de etanol de 30, 20 y 10%.

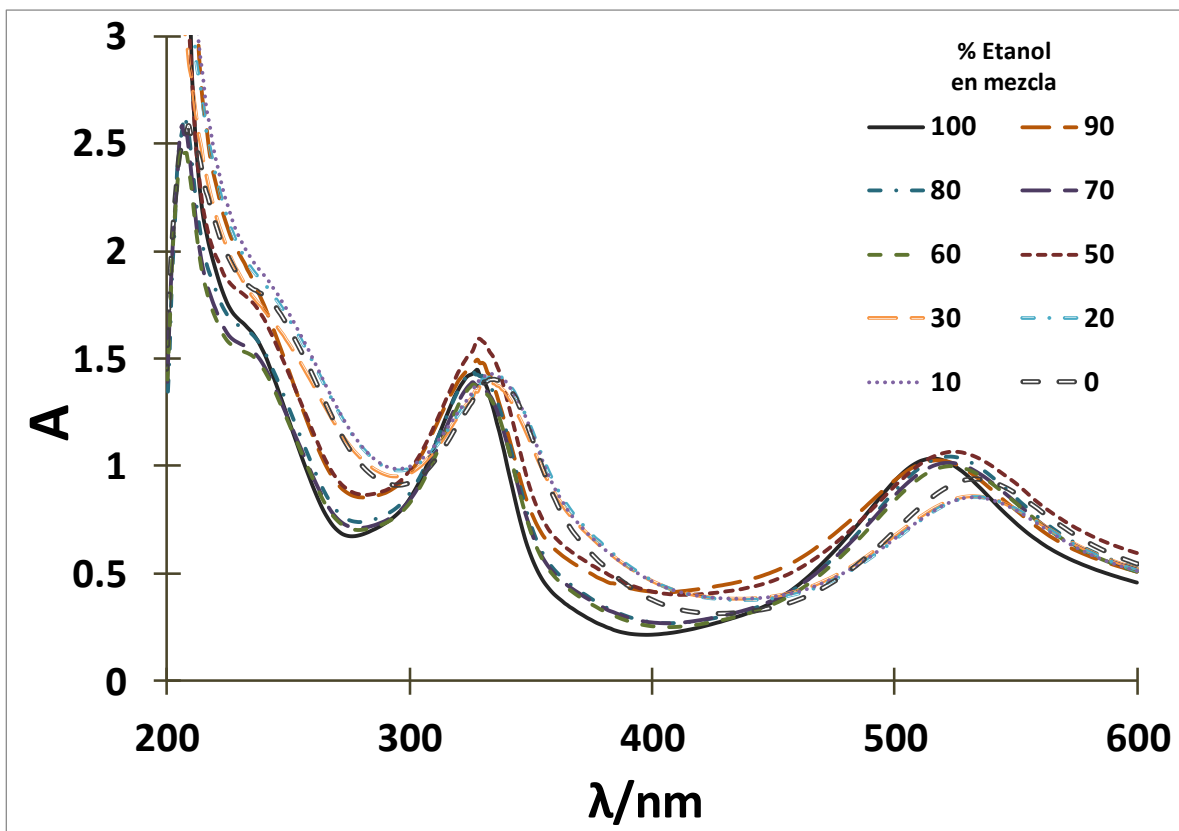


Figura 12. Espectros UV del DPPH[•] 100 μM en las diferentes mezclas Etanol-Agua desionizada al inicio de la prueba de estabilidad.

A medida que se incrementa el porcentaje de volumen de solución acuosa en el sistema, se presenta un efecto batocrómico. Para los tres sistemas con diferentes amortiguadores ocurre en forma similar (de 516 nm a 524

nm) hasta que se tiene un volumen de 60 % de solución acuosa en la mezcla, esto se aprecia en la figura 13.

En el caso de las mezclas con menor contenido de etanol (30 a 0 %) se observa un desplazamiento mayor que va de 530 a 545 nm en la longitud de onda del máximo de absorción. Además, el comportamiento ya es diferente entre las soluciones acuosas, posiblemente porque la influencia del pH en el radical es mayor al predominar el medio acuoso en la mezcla.

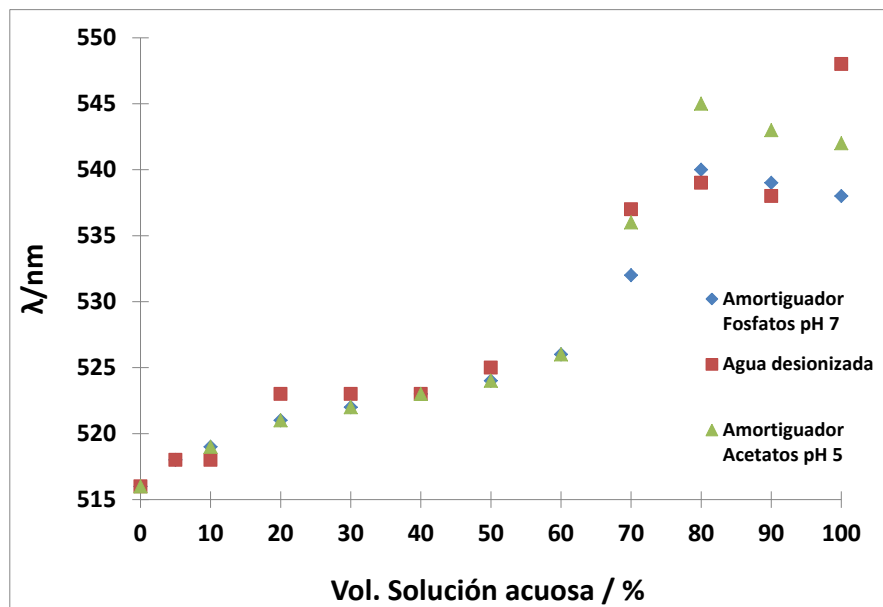


Figura 13. Longitud de onda del máximo de absorbancia contra el porcentaje de volumen de solución acuosa en el sistema al transcurso de 40 minutos de la prueba de estabilidad.

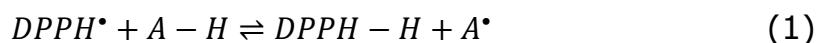
Debido a esto se puede concluir que las mezclas de etanol solución acuosa que presentan la mejor estabilidad para el DPPH• son las mezclas que van del 90 al 40 % de contenido de etanol con los amortiguadores de fosfatos, acetatos y agua desionizada.



CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LA REACCIÓN DEL TROLOX CON EL RADICAL DPPH• EN MEZCLAS ETANOL-AGUA.

En 1958 M. Blois introdujo por primera vez el método espectrofotométrico de la determinación de actividad antioxidante con el radical DPPH• [14] y, posteriormente, en 1997 Brand-Williams y colaboradores hicieron algunas modificaciones al método [15] ellos proponen las reacciones (1) y (2) del DPPH• con un antioxidante o una especie radical.



Cuando el DPPH• se encuentra en disolución presenta un color morado debido a su electrón desapareado y presenta una fuerte absorción entre 514-520 nm. Después de reaccionar con el antioxidante, el DPPH• es reducido y la disolución cambia a un color amarillo pálido, perdiendo así su absorción característica a esta longitud de onda. Eso permite que este cambio sea fácilmente seguido espectrofotométricamente. [14]

TROLOX

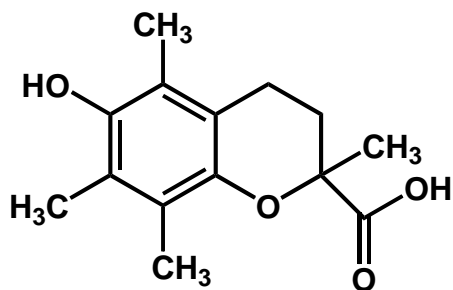


Figura 14. Estructura molecular del Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchromanol-2-carboxílico (Trolox).

El Trolox o Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchromanol-2-carboxílico, es un antioxidante derivado de la vitamina E (figura 14). Fue sintetizado por primera vez por Scott et. al. en el año de 1974 [34], de los diferentes derivados de la vitamina E es uno de los que ha presentado las mejores características capacidad antioxidante. Debido a eso se encuentra dentro de los estándares más usados para determinar capacidad antioxidante y presenta una absorción a 290 nm que no varía estando en medio acuoso o etanólico (figura 15). [20]

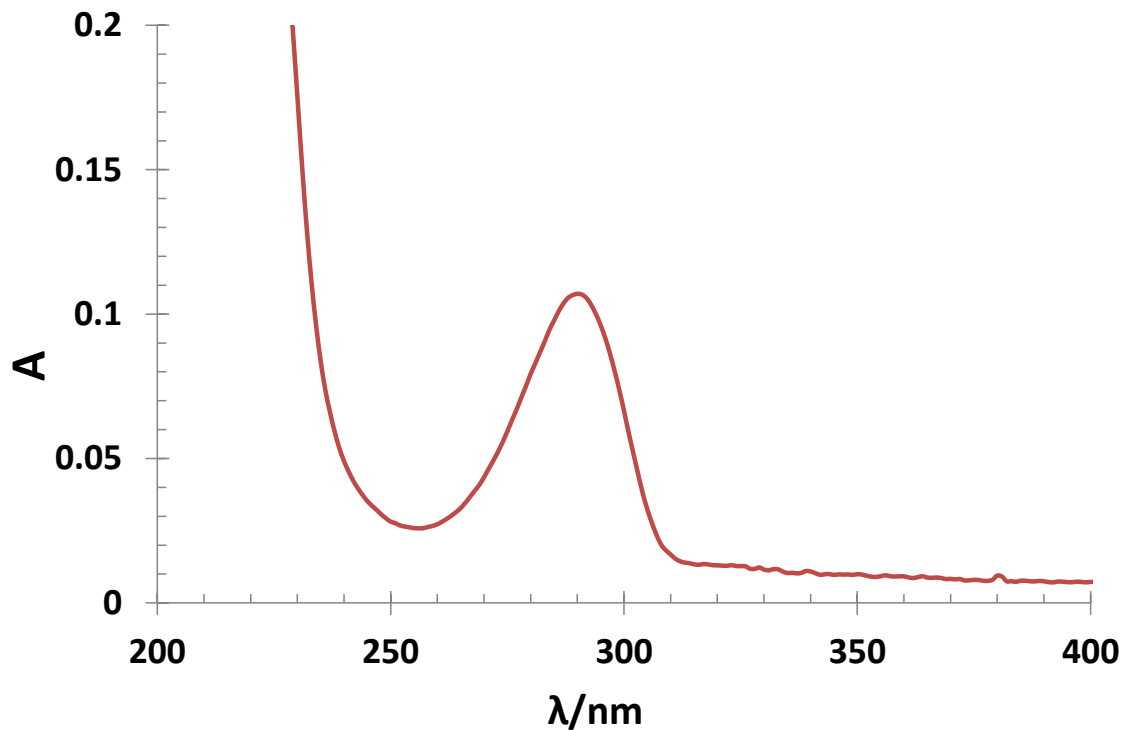


Figura 15. Espectro de absorción UV-VIS de Trolox (42.7 ± 1.1) μM en etanol.

La capacidad antioxidante se puede determinar: como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (CAET) que es una comparación entre la actividad del Trolox (TrOH) y la sustancia de estudio [21-22].

El método clásico para medir la CAET es realizado con el radical ABTS [35]. Sin embargo, su uso era más complicado al necesitar una preparación previa para formar el radical ABTS, por lo que después se implementó una modificación al método cambiando por el radical DPPH• que no necesita preparación previa y tiene un uso más sencillo.

Friaa propone una reacción entre el Trolox y el DPPH• que se muestra en la figura 16, dando como resultado una estequiometria de Trolox-DPPH• 1:2 [20]. A pesar de que el Trolox solo tenga un hidrógeno fenólico disponible, cuando éste reacciona con una molécula de DPPH•, el radical resultante (TrO•) es muy inestable y de inmediato reacciona con una segunda molécula de DPPH•.

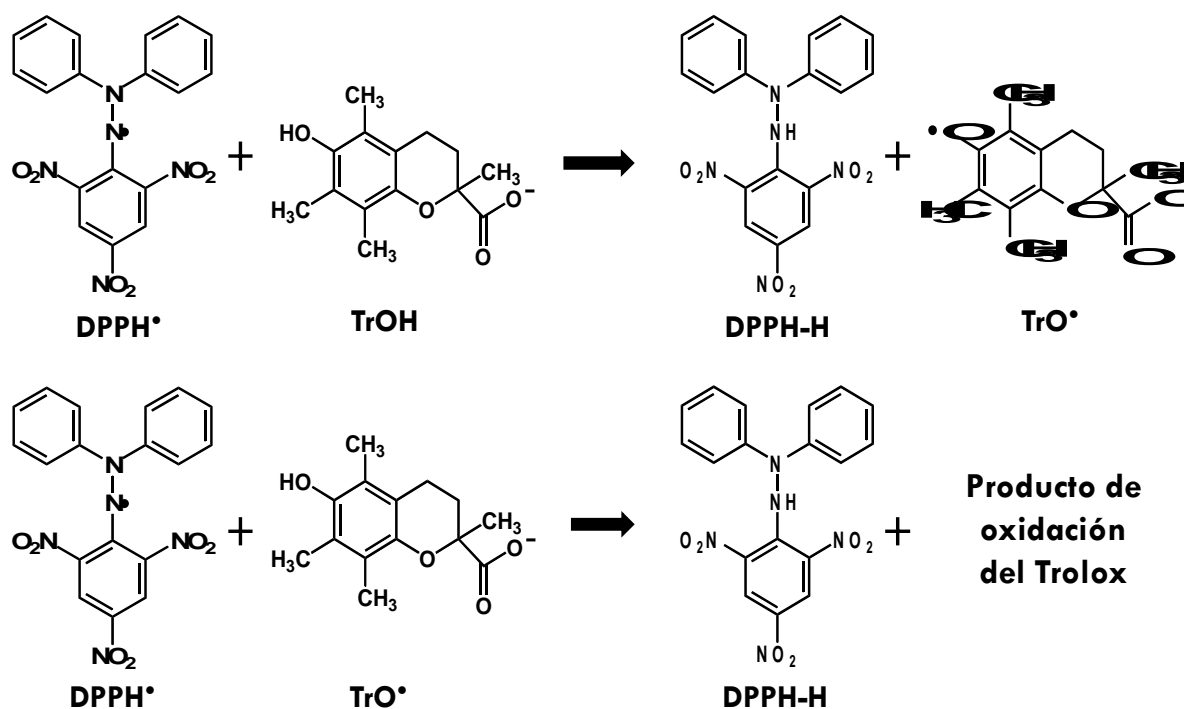


Figura 16. Reacción entre el radical DPPH• y la molécula de Trolox. [20]

Iuliano y Oehlke han reportado como productos de oxidación del Trolox, con Cu^{2+} , Fe^{3+} y LDL, el compuesto Trolox-quinona (figura 17). [36]

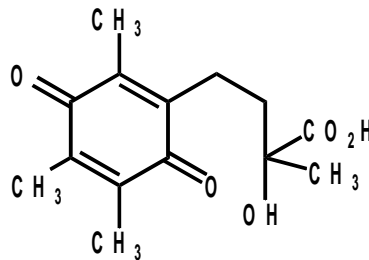


Figura 17. Estructura molecular de del Trolox-quinona.

Iualiano propone el mecanismo de reacción de la oxidación de Trolox con lipoproteína de baja densidad (LDL) presentado en la figura 18. Al ser un mecanismo similar al de la reacción de DPPH• y Trolox podría indicarnos que el producto de oxidación final del Trolox es su respectiva quinona.

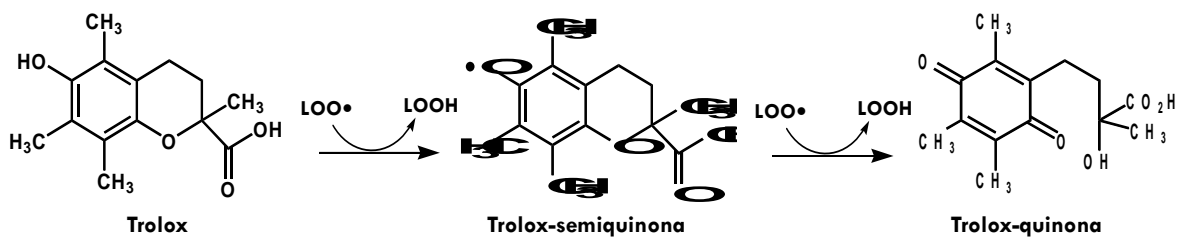


Figura 18. Reacción entre LDL y la molécula de Trolox. [36]

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REACCIÓN DE tROLOX CON EL RADICAL DPPH•

Visto esto, una vez que se han encontrado las mejores proporciones para las mezclas etanol-solución acuosa donde el radical DPPH• es más estable, se procede a evaluar la reacción de Trolox con DPPH•.



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

Para monitorear la reacción del DPPH• con Trolox se tomaron espectros UV-VIS en un rango de 700 a 280 nm y a partir de estos se construyeron curvas de calibración.

Las curvas se obtienen graficando la absorbancia, cuando han transcurrido 5 minutos de reacción, contra la concentración de Trolox, que varía de 1 a 50 μM , [21] Se registra la absorbancia a la longitud de onda máxima de cada mezcla de Etanol y solución acuosa. El medio acuoso se varió usando solución amortiguadora de fosfatos pH 7, solución amortiguadora Tris pH 8 y solución amortiguadora de acetatos pH 5.

Se realizaron para cada sistema las mezclas con 80, 70, 60 y 50 % de etanol, además de un control en 100 % de etanol.

Las mezclas se prepararon en la celda espectrofotométrica añadiendo 100 μL de DPPH• 0.0020 M para tener una concentración del radical en celda de 0.0001 M. Para cada medición en la curva de calibración se agregan distintas alícuotas de las soluciones de concentración 1 mM ó 10 mM de Trolox, ajustando en todos los casos un volumen final de celda de 2.0 mL con etanol y solución acuosa dependiendo de la mezcla a manejar.

RESULTADOS

En la figura 19 se observan los espectros de absorción a 5 minutos de reacción del DPPH• con Trolox en etanol. Se puede ver que la banda en 516 nm disminuye hasta desaparecer con la concentración más alta de Trolox que reacciona en su totalidad con el DPPH•.

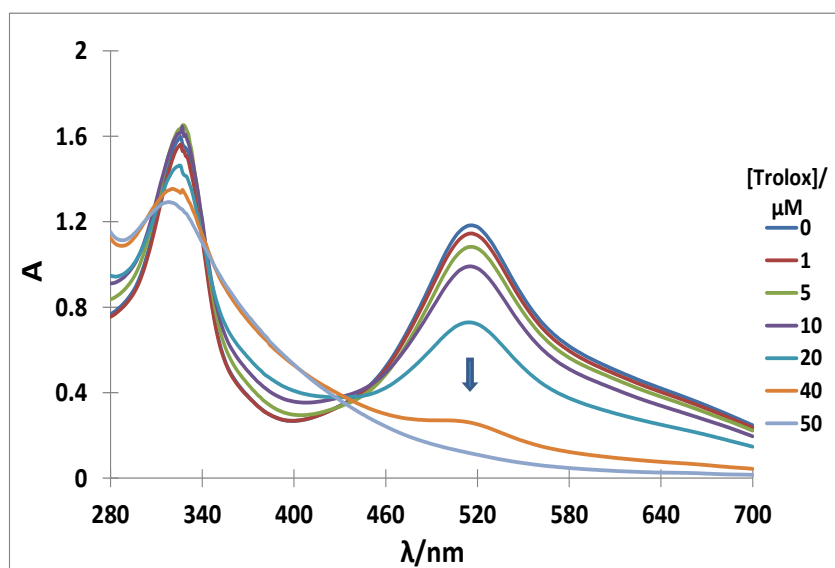


Figura 19. Espectros de absorción para el DPPH• (100.6 ± 2.1) μM con Concentraciones de Trolox (0 -50 μM) en etanol.

Para evaluar la reacción del DPPH• con la molécula de Trolox se obtienen las curvas de absorbancia contra tiempo, en un tiempo total de 5 minutos. Pasado este tiempo las curvas se mantienen estables y sin presentar cambios (figura 20a). Cuando la reacción de Trolox con DPPH• ha alcanzado la estabilidad se toma el valor de la absorbancia y se grafica para construir las curvas de calibración como: absorbancia en función de concentración de Trolox ($[\text{Trolox}]$) como se muestra en la figura 20b. Esta

curva de calibración muestra un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0.99.

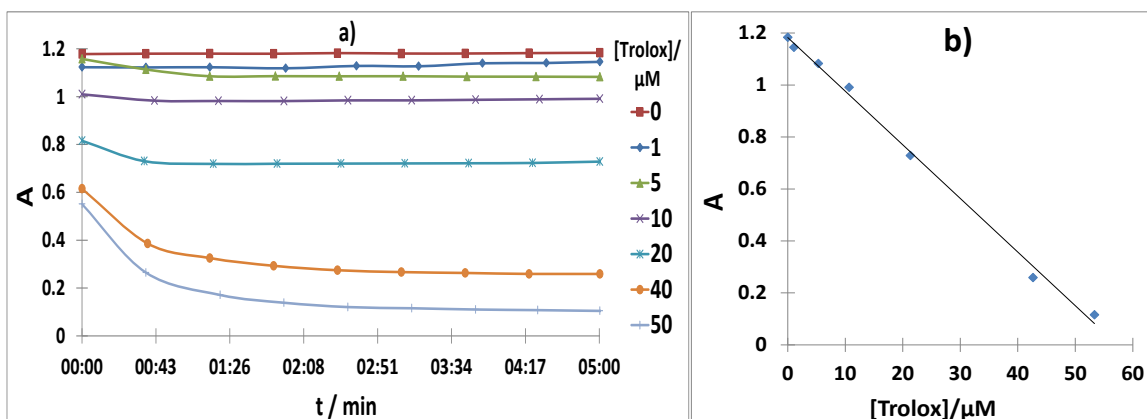


Figura 20. a) Curvas de Absorbancia vs. Tiempo. b) Curva de calibración de Absorbancia contra $[\text{Trolox}]/\mu\text{M}$. Ambas para la reacción de Trolox con DPPH^\bullet en etanol.

En la figura 21 se observan los espectros obtenidos para diferentes porcentajes de mezcla entre etanol y AF que son de 80, 70, 60 y 50 % de contenido de etanol después de reaccionar 5 minutos. Para cada uno de ellos se observa que comienza a aparecer una banda a 418 nm a medida que la banda a 524 nm comienza a desaparecer por la reacción con Trolox. Además, en las mezclas de 50 y 60 % de etanol se tiene un efecto hipsocrómico con respecto a las mezclas con mayor volumen de etanol. También se ve para las concentraciones de Trolox de 40 y 50 μM ya no existe ningún cambio en el espectro. Puede deberse a que la banda interferente no permite observar más cambios en el espectro y/o el DPPH^\bullet ha reaccionado en su totalidad en la mezcla 50:50 de etanol con amortiguador de fosfatos.

En una solución etanólica cuando el DPPH^\bullet ha reaccionado por completo con el Trolox la solución se torna amarillo pálido. En cambio, cuando el

DPPH[•] reaccionó con el Trolox en las mezclas etanol-amortiguador de fosfatos la solución cambiaba a un color café.

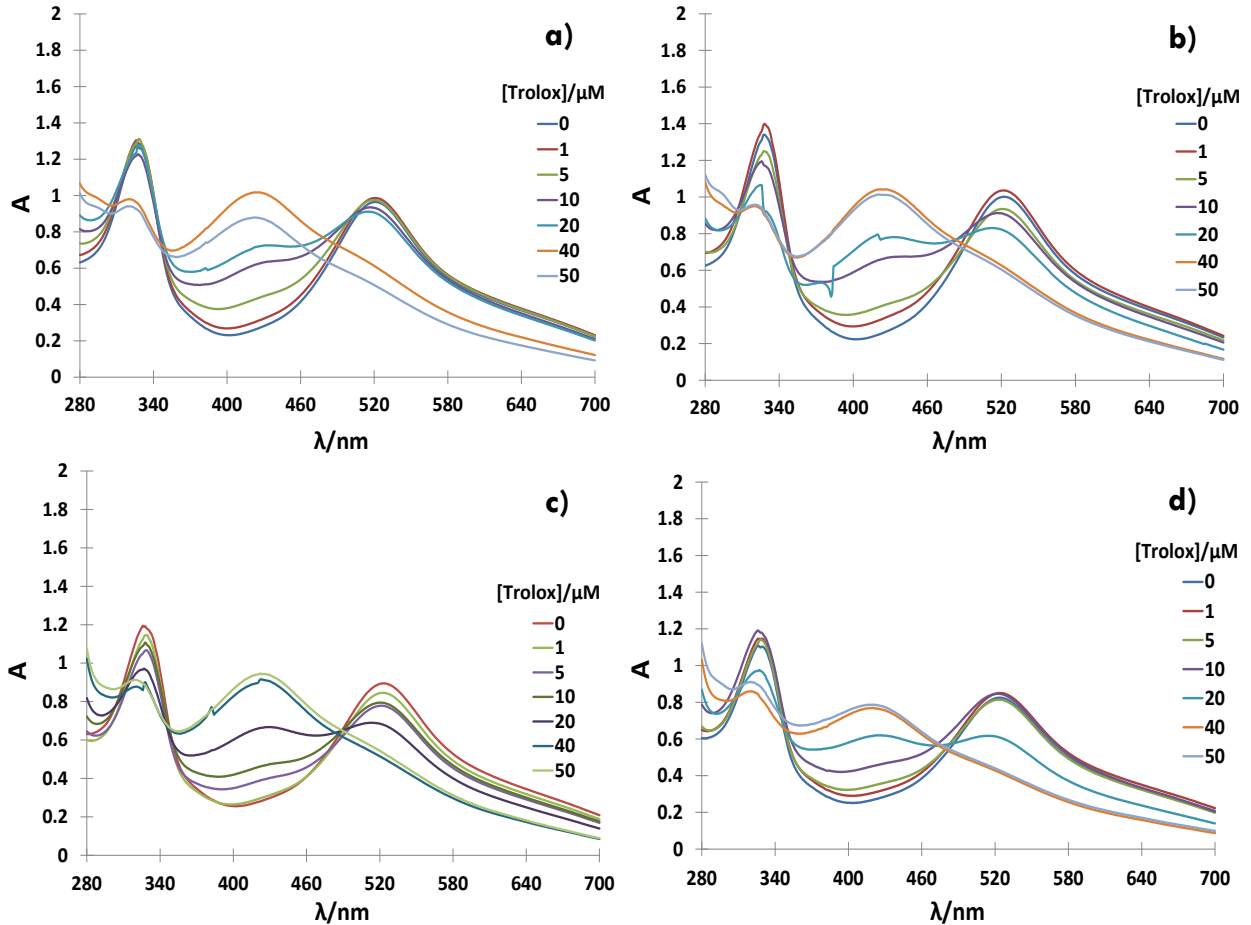


Figura 21. Espectros de absorción UV-VIS para la reacción de DPPH[•] (98.9 ± 2.9) μM con Trolox tras pasados 5 minutos en diferentes mezclas de etanol:amortiguador de fosfatos (2.012 ± 0.016) mM pH 7 (v/v): a) 80:20, b) 70:30, c) 60:40 y d) 50:50

Para saber si la influencia se debía a los iones de fosfatos o a la mezcla con agua se repitió el estudio ahora con agua desionizada en los mismos porcentajes de mezclas que se observan en la figura 22.

Vemos que para todas las mezclas la señal que se presenta en 520 a 524 nm desaparece en su totalidad al llegar a la adición de Trolox de 40 μM , y se conserva la linealidad de la curva de calibración hasta la adición de



Trolox 20 μM . También se observa que no aparece la banda interferente en 418 nm.

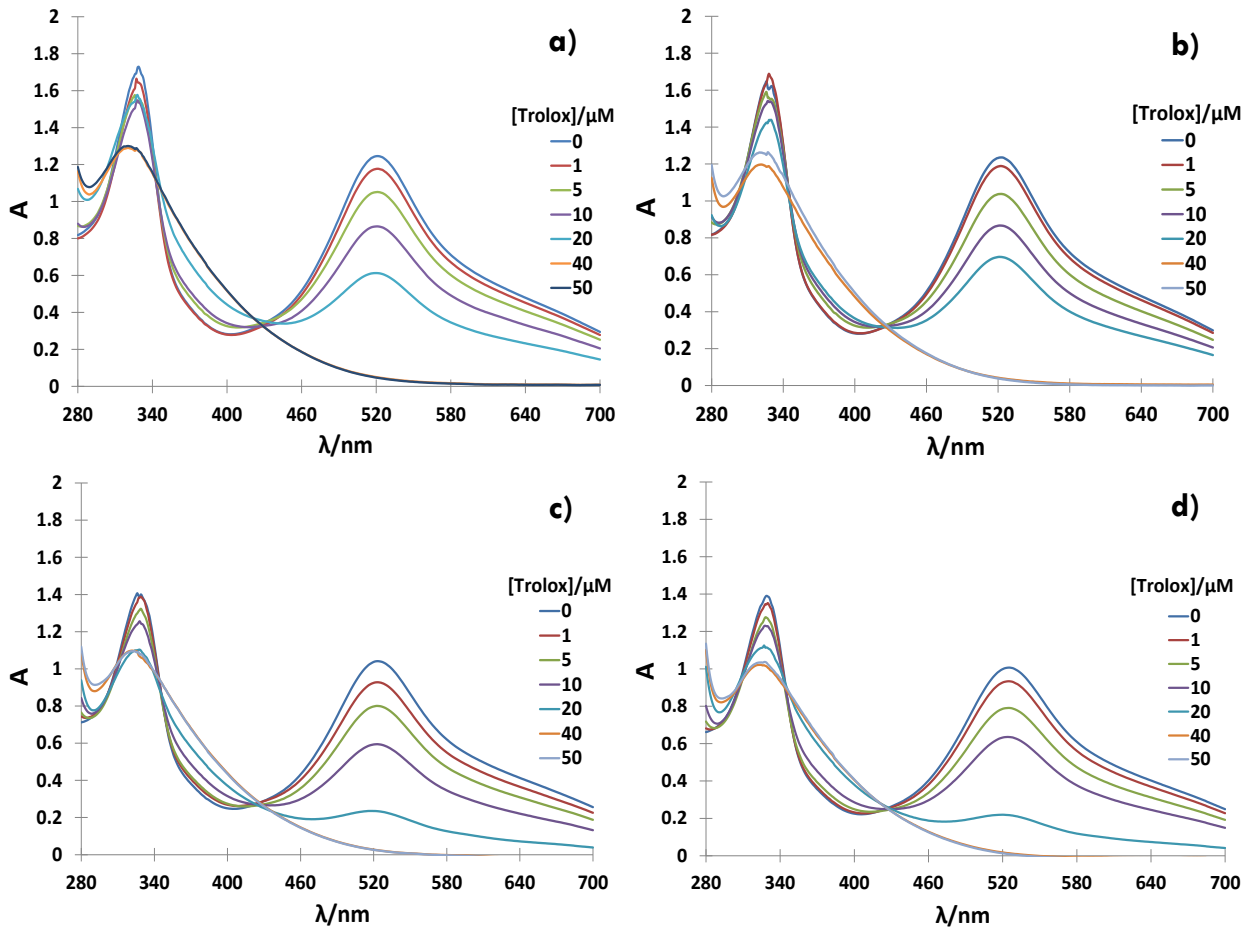


Figura 22. Espectros de absorción UV-VIS para la reacción de DPPH^* (98.2 ± 2.7) μM con Trolox tras pasados 5 minutos en diferentes mezclas de etanol:agua desionizada (v/v): a) 80:20, b) 70:30, c) 60:40 y d) 50:50

Posteriormente se deseó evaluar el efecto de diferentes valores de entre la reacción de Trolox con el radical, lo que llevó a realizar estas pruebas en mezclas con Tris pH 8 y Amortiguador de acetatos a pH 5.

En la figura 23 se reportan los espectros que se obtuvieron en mezclas de EtOH-Tris.

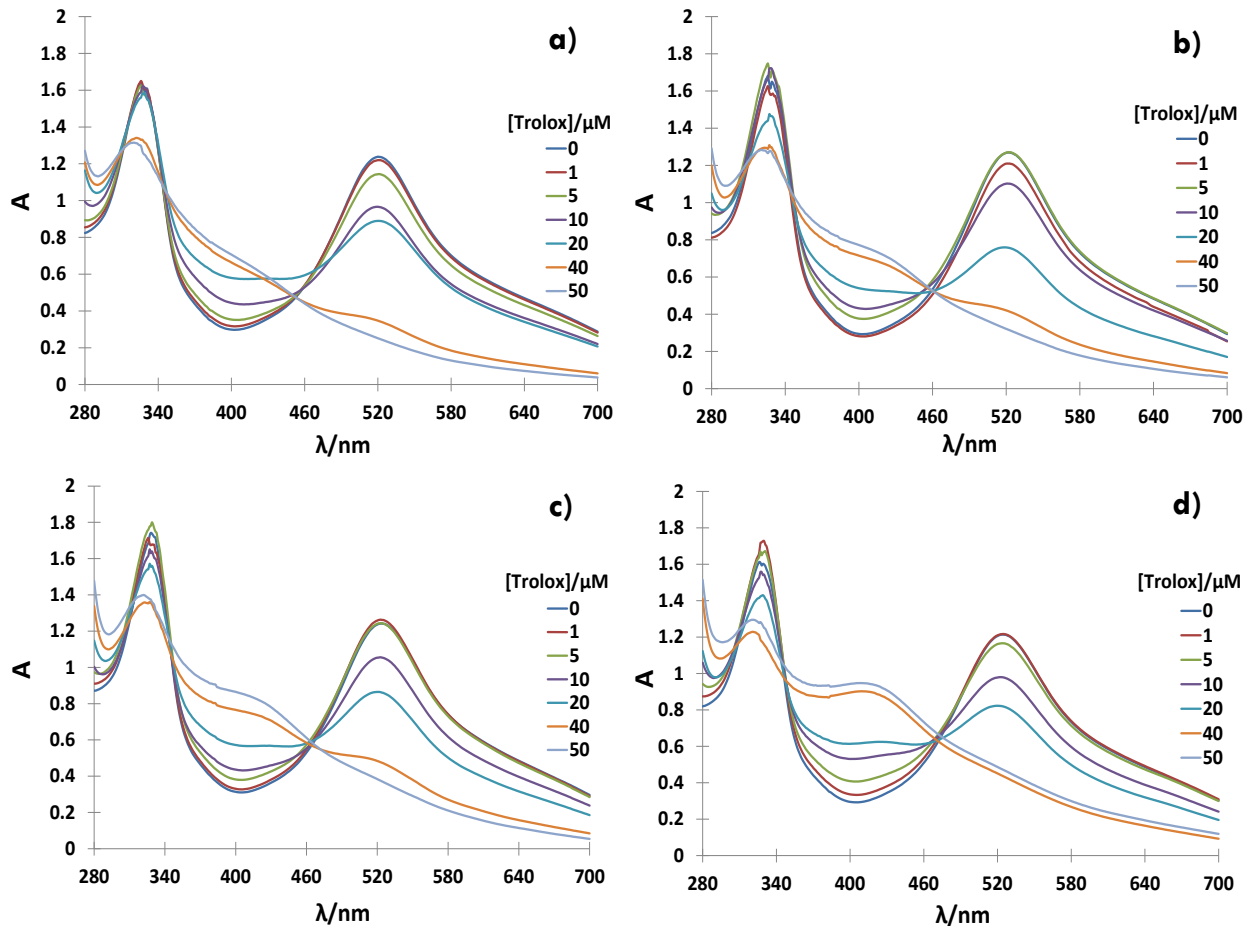


Figura 23. Espectros de absorción UV-VIS para la reacción de DPPH* (102.1 ± 2.9) μM con Trolox tras pasados 5 minutos en diferentes mezclas de etanol:Tris (5.053 ± 0.020) mM pH 8 (v/v): a) 80:20, b) 70:30, c) 60:40 y d) 50:50

Al evaluar la reacción ahora con amortiguador Tris a pH 8.0 vemos como para la mezcla 50:50 EtOH:Tris, se tiene un comportamiento similar a cuando se tiene amortiguador de fosfatos a pH 7.0. La banda aquí aparece a 408 nm a medida que la banda en 524 nm comienza a desaparecer por la reacción con Trolox. Al final la de la reacción la solución presenta un color amarillo fuerte. Efecto que se disminuye cuando se tiene una mayor cantidad de etanol en la mezcla como se ve en las mezclas de 80 y 70 % de etanol (figura 23 a y b).

Por lo que se realizó la reacción de DPPH* con Trolox en mezclas de etanol con amortiguador de acetatos a pH 5.0 (figura 24). Se observa que tiene

un comportamiento similar a cuando se realiza la reacción en medio etanólico y ya no aparece la banda interferente a 418 nm para fosfatos y 408 nm para Tris.

El comportamiento observado es similar a cuando la reacción se lleva a cabo en etanol y el color final de la solución es un amarillo claro.

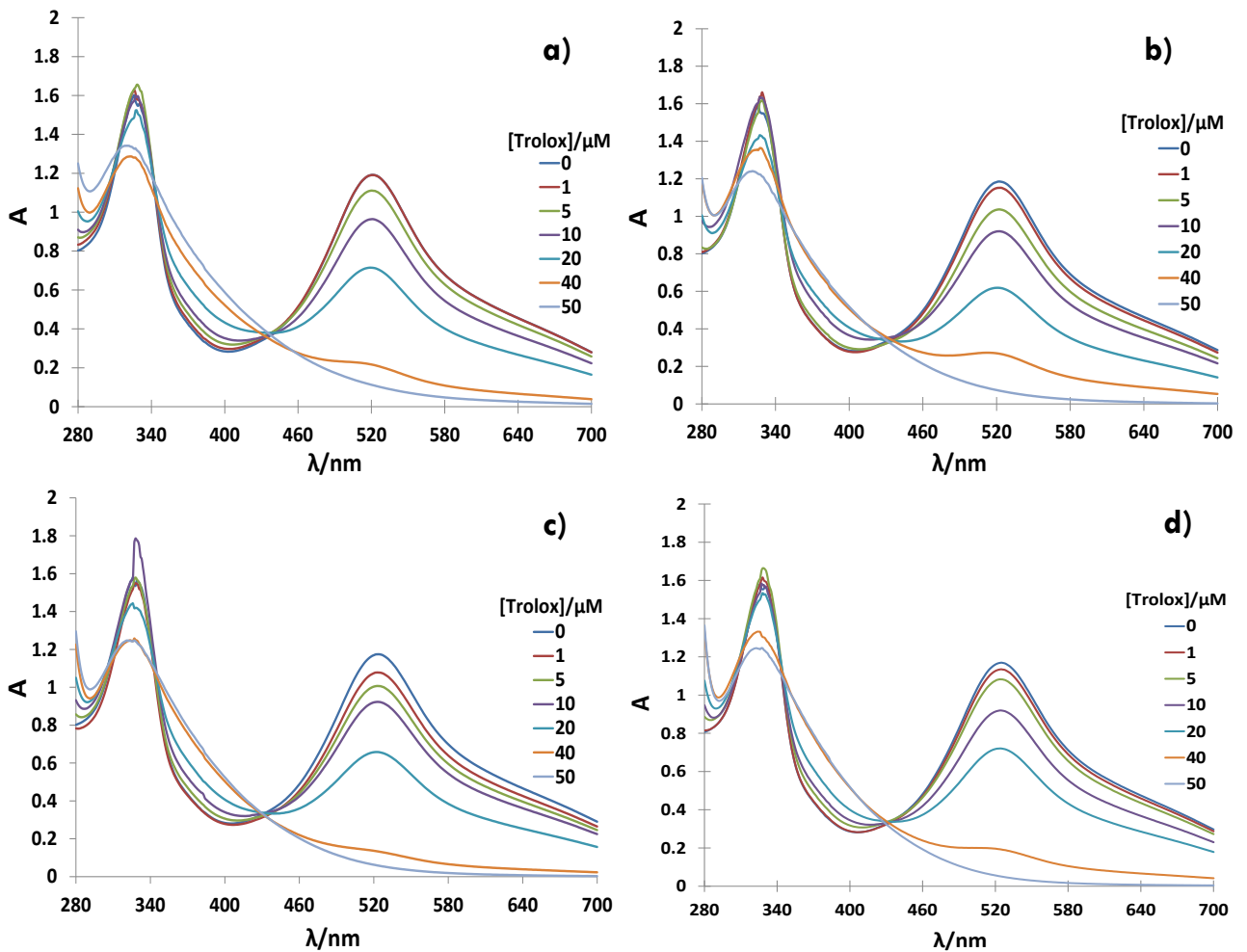


Figura 24. Espectros de absorción UV-VIS para la reacción de DPPH• (101.2 ± 2.8) μM con Trolox tras pasados 5 minutos en diferentes mezclas de Etanol:amortiguador de acetatos (5.203 ± 0.231) mM pH 5 (v/v): a) 80:20, b) 70:30, c) 60:40 y d) 50:50.

En la figura 25 se tienen las curvas de absorbancia contra el tiempo de la reacción de Trolox 50 μM con el radical DPPH• y se observa como con el

amortiguador de acetatos a pH 5 se logra disminuir la absorbancia incluso más que cuando hay etanol pues ya no se presenta la banda interferente.

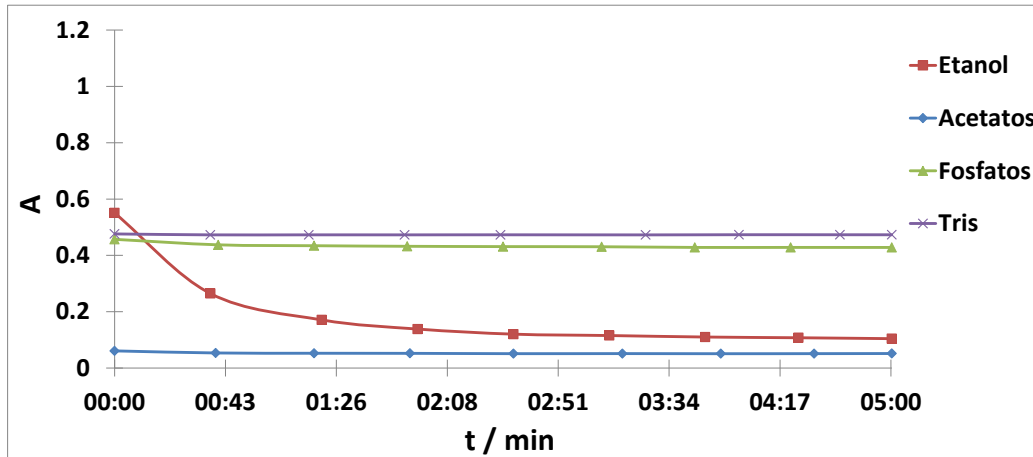


Figura 25. Curvas de Absorbancia vs. Tiempo para la reacción de Trolox 50 μM con DPPH^\bullet 100 μM en mezclas de etanol con diferentes soluciones acuosas en una proporción de 50:50 (v/v).

En la tabla 2 se recopilieron los datos obtenidos de la curva de calibración de cada mezcla con las diferentes soluciones acuosas y se observa como para los amortiguadores de fosfatos y Tris disminuye la pendiente, por lo que disminuye la sensibilidad del método, además que se reduce la linealidad a medida que aumenta su volumen en la mezcla.

Para el amortiguador de acetatos a pH 5 se encontraron correlaciones mayores a 0.99 para la mayoría de las mezclas. Y con la que se obtiene los mejores valores es la mezcla de 50:50 etanol:amortiguador de acetatos al tener la mayor pendiente y un valor de R^2 de 0.9966.

Tabla 2. Conjunto de datos obtenidos para las curvas de calibración de las mezclas de etanol con diferentes soluciones acuosas.

Amortiguador	pH	Etanol (%)	Pendiente/ μM^{-1}	R^2	λ Máx / nm
Fosfatos	7	100	-0.0206	0.9962	516
		80	-0.0092	0.9529	521
		70	-0.0084	0.9721	522
		60	-0.0086	0.9680	523
		50	-0.0106	0.9280	524
Tris	8	80	-0.0192	0.9851	521
		70	-0.0191	0.9701	523
		60	-0.0176	0.9870	524
		50	-0.0157	0.9569	524
Acetatos	5	80	-0.0214	0.9924	521
		70	-0.0207	0.9910	522
		60	-0.0213	0.9875	524
		50	-0.0227	0.9966	524
Agua desionizada	-	80	-0.0237	0.9715	521
		70	-0.0238	0.9743	523
		60	-0.0192	0.8886	524
		50	-0.0194	0.8970	525

En la figura 22 se puede observar que para el espectro UV-Vis del DPPH[•] y Trolox, el producto de la reacción entre éstos presenta una banda a 418 nm para las mezclas de etanol con amortiguador de fosfatos; y una banda en una longitud de 408 nm para las mezclas de etanol y amortiguador Tris como se observa en la figura 23. Debido a eso se elige como medio el amortiguador de acetatos pH 5 y dentro de las diferentes mezclas, las condiciones en que se lleva mejor la reacción de Trolox y DPPH[•] es cuando se tiene una mezcla de 50:50 etanol con amortiguador de acetatos pH 5 que, como se observa en la tabla 2, presenta un valor de R^2 de 0.9966 y una sensibilidad de $0.0227 \mu\text{M}^{-1}$.



ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL DPPH[•] REDUCIDO EN FUNCIÓN DEL pH

Como anteriormente se vio la molécula de DPPH-H es influenciada por el pH en el que se encuentre y se denota por los cambios en su espectro UV-VIS, por lo que se decidió hacer análisis de este comportamiento a diferentes valores de pH.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para el cálculo del pK_a de la molécula de DPPH-H se reduce el radical DPPH[•] con un exceso de Trolox en una mezcla 50/50 de amortiguador Britton-Robinson 0.04992 M y etanol. Se hace el experimento obteniendo los espectros de absorción de la molécula y variando el pH de 5.000 A 11.057 aumentándolo en 0.2 unidades con una solución de NaOH. Después se alimentan los espectros de absorción al programa computacional SQUAD en donde se obtiene el valor de pK_a y las absorptividades de la molécula de DPPH-H.

RESULTADOS

Para conocer el comportamiento de la especie reducida del DPPH• se obtuvieron los espectros de absorción a diferentes valores pH desde un pH 5.000 hasta un pH de 11.057, en el intervalo de longitudes de onda de 240 hasta 800 nm en una mezcla de etanol con amortiguador Britton-Robinson 50:50 (v/v).

En la figura 26 se presentan algunos de los espectros obtenidos y se observa que a partir de un pH 8 comienza a aparecer una banda en 429 nm la cual a medida que aumenta el pH incrementa su absorbancia.

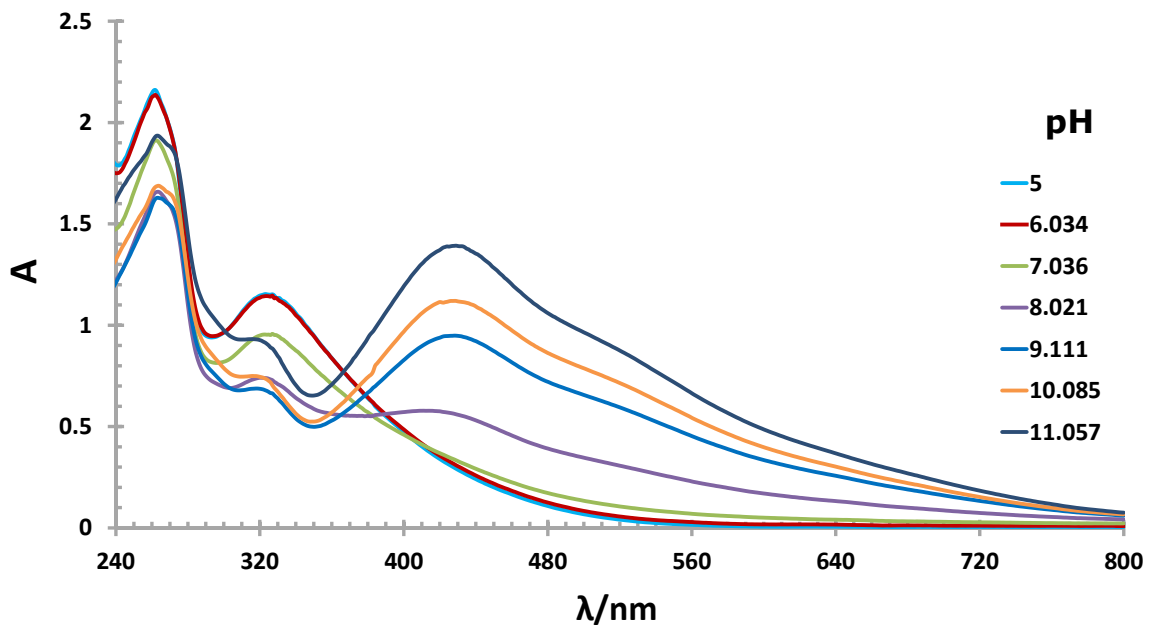


Figura 26. Espectros de absorción UV-VIS para la molécula DPPH-H $103.2 \pm 2.8 \mu\text{M}$ a diferentes valores de pH en una mezcla 50:50 de etanol con amortiguador Britton-Robinson 0.04992 M.



Como se observa al menos un punto isobéptico es indicativo de que existe al menos un equilibrio ácido base del DPPH-H, por lo que se propone determinar la constante asociada al equilibrio

Para el cálculo de los valores de pK_a que tiene la molécula de DPPH-H se utilizó el programa computacional SQUAD en el cual se alimentaron los datos de absorción en función de la longitud de onda obtenida en los espectros de absorción a diferentes pH. Se propone también un modelo químico y los valores aproximados de pK_a para la molécula. En la figura se grafica la absorbancia seguida a la longitud de onda de 429 nm contra el pH y en la curva graficada podemos ver dos puntos de equivalencia en un pH de 8.1 y 10.2 aproximadamente que serán los valores de pK_a que se alimentarán en el programa. También nos indica que la molécula de DPPH-H presenta dos desprotonaciones en vez de una como es propuesto por Friaa et. al. [37].

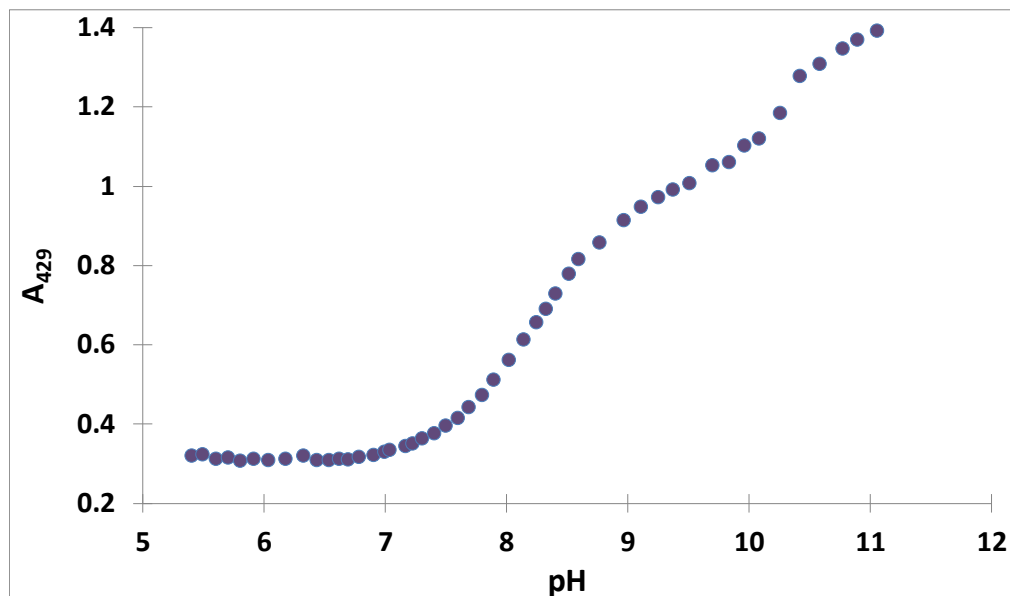


Figura 23. Gráfico de Absorbancia a 429 nm contra el pH.

Una vez corra SQUAD nos dará como resultado los valores de pK_a que son refinados y obtenemos como valor para el primero 8.126 ± 0.007 y para el segundo 10.356 ± 0.005 . También son calculadas las absorptividades de la molécula neutra de DPPH-H que denominaremos H_2D y sus especies aniónicas HD^- y D^{2-} . En la figura se observan los coeficientes de absorptividad para las tres especies.

Para la especie neutra tenemos un solo máximo de absorptividad en una longitud de onda de 324 nm, las especies aniónicas presentan dos máximos de absorptividad en las longitudes de onda de 316 y 428 nm. Sin embargo, la especie dianiónica tiene valores más grandes de coeficientes de absorptividad.

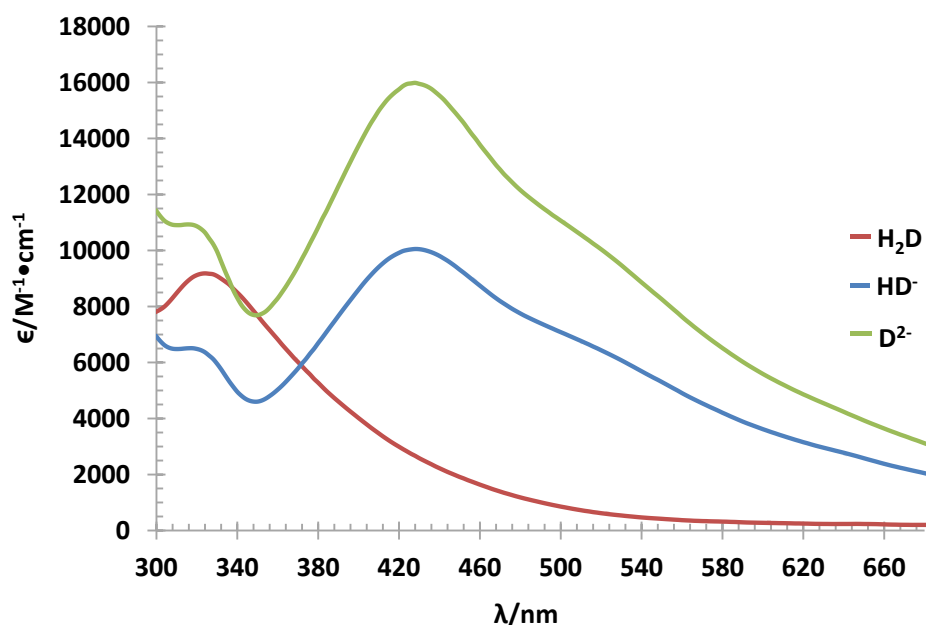


Figura 24. Coeficientes de absorptividad para la molécula de DPPH-H (H_2D) y sus especies aniónicas HD^- y D^{2-} .

Se trazó el diagrama de distribución de especies a partir de los valores de pK_a encontrados para la molécula de DPPH-H. La especie HD^- tiene predominancia desde un pH de 8 hasta un pH de 10.2.

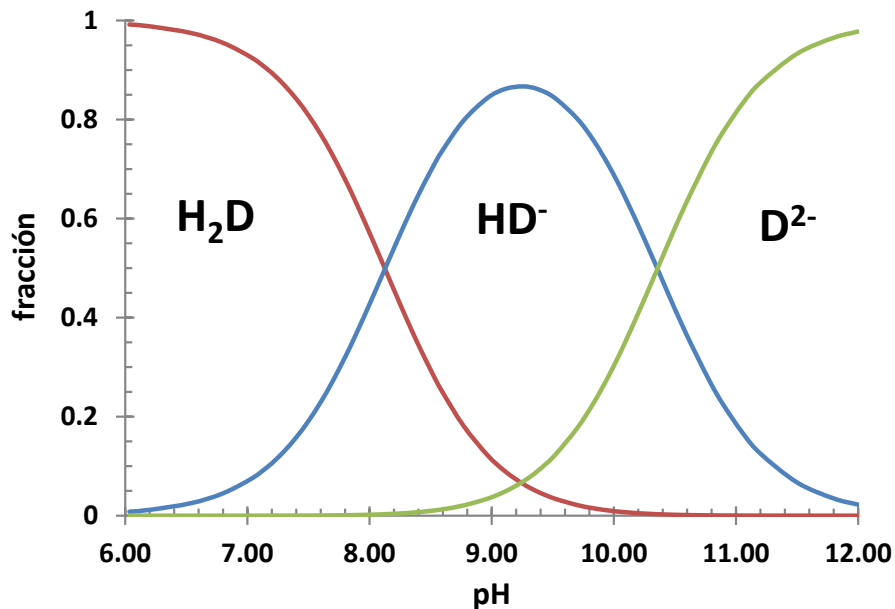


Figura 25. Zonas de predominio de la molécula de DPPH-H.

Con los valores de absorptividad obtenidos para la especie neutra y aniónicas del DPPH-H se hizo la simulación de los espectros y se compararon con los espectros experimentales. En la figura se muestra la comparación entre los espectros simulados y los experimentales. Se puede ver que los espectros a valores de pH 9.111, 10.085 y 11.057 son los que mejor son reproducidos por el cálculo de la absorptividad a partir de la absorptividad.

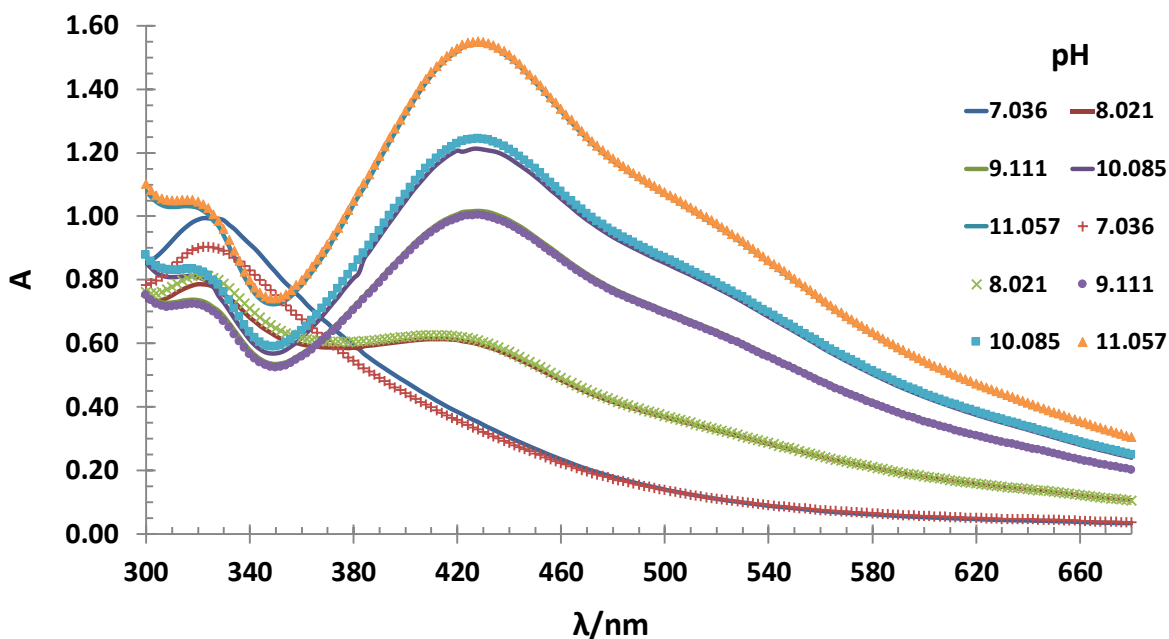


Figura 26. Espectros para diferentes valores pH del DPPH-H, experimentales en línea continua y simulados en línea punteada.

De acuerdo a los diagramas de predominio de la molécula de DPPH-H vemos que a valores de pH mayores a 6 comienza a formarse su especie desprotonada lo que da lugar a una banda con un máximo de absorbancia en 418 nm. Que como se vio previamente interfiere con la determinación de CAET con DPPH[•] en pH 7 y 8. Por lo que se deberá trabajar para determinar CAET espectrofotométricamente en valores de pH menores a 6.



COMPARACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A TROLOX CON EL RADICAL DPPH• EN ETANOL Y EN MEZCLA DE ETANOL-AMORTIGUADOR DE ACETATOS.

Ya que se encontró que la mezcla de 50:50 de etanol con amortiguador de acetatos pH 5 para determinar la capacidad antioxidante equivalente a Trolox con el radical DPPH• se compara este método con respecto al tradicional con etanol usando una muestra de ácido cafeico y otra de ácido gálico.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para construir la curva de calibración se tomaron espectros UV-VIS en un rango de 700 a 280 nm durante 5 minutos de la reacción entre Trolox y DPPH• en medio de etanol y en mezcla de etanol y amortiguador de fosfatos pH 5.

Las curvas se obtienen graficando la absorbancia, cuando han transcurrido 5 minutos de reacción, contra la concentración de Trolox, que varía de 1 a 50 μM ,

La mezcla se preparó en la celda espectrofotométrica añadiendo 100 μL de DPPH• 0.0020 M para tener una concentración del radical en celda de 0.0001 M. Para cada medición en la curva de calibración se agregan distintas alícuotas de las soluciones de concentración 1 mM ó 10 mM de Trolox, ajustando en todos los casos un volumen final de celda de 2.0 mL con etanol y solución acuosa dependiendo de la mezcla a manejar.

Para la medición de la muestra se sigue el mismo procedimiento, pero solo con una concentración de 20 μM de ácido cafeico y de 10 μM para el ácido gálico.



RESULTADOS

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante de cada muestra se encuentran recopilados en la tabla 3 donde se comparan con valores encontrados en la literatura. Los valores encontrados para las determinaciones hechas en mezcla son similares a las hechas en etanol lo que nos indica que la implementación de la mezcla no afecta en la determinación de CAET de diferentes antioxidantes. El mayor error que se tiene en comparación a los valores de la literatura se encuentra para la muestra de ácido gálico lo que puede deberse al error de tiempo para la determinación de eficiencia antioxidante ya que la muestra requería más tiempo para estabilizarse.

Tabla 3. Resultados obtenidos para la determinación de capacidad antioxidante para en un medio etanólico y mezcla 50:50 de etanol y amortiguador de acetatos (5.203 ± 0.231) mM a pH 5. Donde n es el número de moléculas de DPPH* que reaccionan con un antioxidante.

Muestra	Parámetros	Etanol	Mezcla	Literatura	Referencia
Trolox	CAET	1	1	1	[35]
	EC ₅₀ /μM	27.28	25.61	27.01	[38]
	TEC ₅₀ /min	5	5	5-10	[35]
	AE	0.007332	0.00781	0.0109	[24]
	n	1.95	1.939	2.0	[24]
Ac. Caféico	CAET	1.24 ± 0.18	1.17 ± 0.31	1.26	[39]
	EC ₅₀	24.15	26.53	17.03	[38]
	TEC ₅₀	7	7	5.26	[40]
	AE	0.006023	0.00538	0.0024	[24]
	n	2.13 ± 0.38	2.07 ± 0.39	2.3	[24]
Ac. Gálico	CAET	2.40 ± 0.73	3.31 ± 0.99	3.00	[39]
	EC ₅₀	12.08	7.983	7.49	[38]
	TEC ₅₀	10	10	14.69	[40]
	AE	0.008276	0.0126	0.0037	[24]
	n	4.44 ± 1.33	6.14 ± 1.69	6.1	[24]



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CAPÍTULO 5

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL RADICAL DPPH[•] CON UN ELECTRODO DE TRABAJO DE PASTA DE CARBONO.

El radical DPPH[•] ha sido poco estudiado electroquímicamente. La primera referencia que se le hace a en este campo al radical es por Solon en 1963. Él estudió el DPPH[•] por voltamperometría con un electrodo de disco de platino rotatorio en acetonitrilo como solvente. Encontraron que el DPPH[•] presenta un pico anódico y otro catódico; y reportan un intercambio de 1 electrón involucrado en la reacción de oxidación y otro en la reacción de reducción [41], lo que fue validado por Hall en 1967.[42]

En la figura 27 se muestran las especies propuestas por Solon para la oxidación y reducción del Trolox.

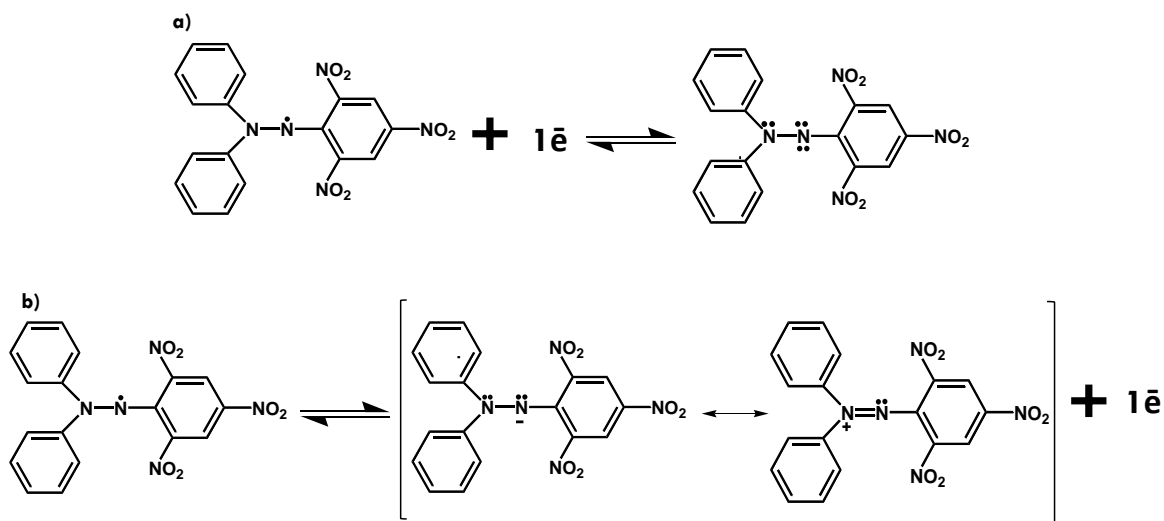


Figura 27. Radical DPPH[•] y la reacción de a) reducción y b) oxidación. [41]

Para estudiar la respuesta electroquímica del DPPH[•] se realizan pruebas con un electrodo de pasta de carbono en la mezcla 50:50 (v/v) de etanol con amortiguador de fosfatos pH 7.



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para estudiar el comportamiento electroquímico de la molécula de DPPH• en amortiguador de fosfatos a pH 7, se obtienen los voltamperogramas cíclicos a una velocidad de barrido de 100 mV/s con un electrodo de trabajo de pasta de carbono, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl), y un electrodo auxiliar de platino en espiral medido en un potenciostato EPSILON/BASI.

También se estudia el comportamiento del radical DPPH• en diferentes mezclas 50:50 (v/v) de etanol con: amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7 y amortiguador de acetatos 0.5 M pH 5.

RESULTADOS

En la figura 28 se muestra el voltamperograma del radical DPPH• comenzando el barrido en 0.5 V yendo hacia reducción hasta un potencial de -0.400 V, donde se observa un pico **I** con un potencial de 0.360 V y una corriente de -1.436 μA . Después, se cambia de sentido yendo hacia oxidación donde se presentan dos picos, el pico **II** en un potencial de 0.475 V y con una corriente de 1.173 μA y el **III** en un potencial de 0.783 V y con una corriente de 8.196 μA . En 1 V se regresa en sentido de reducción hasta el valor de 0.5 V donde se observa un segundo pico de reducción, el **IV**, en un potencial de 0.670 V y con una corriente de -3.409 μA .

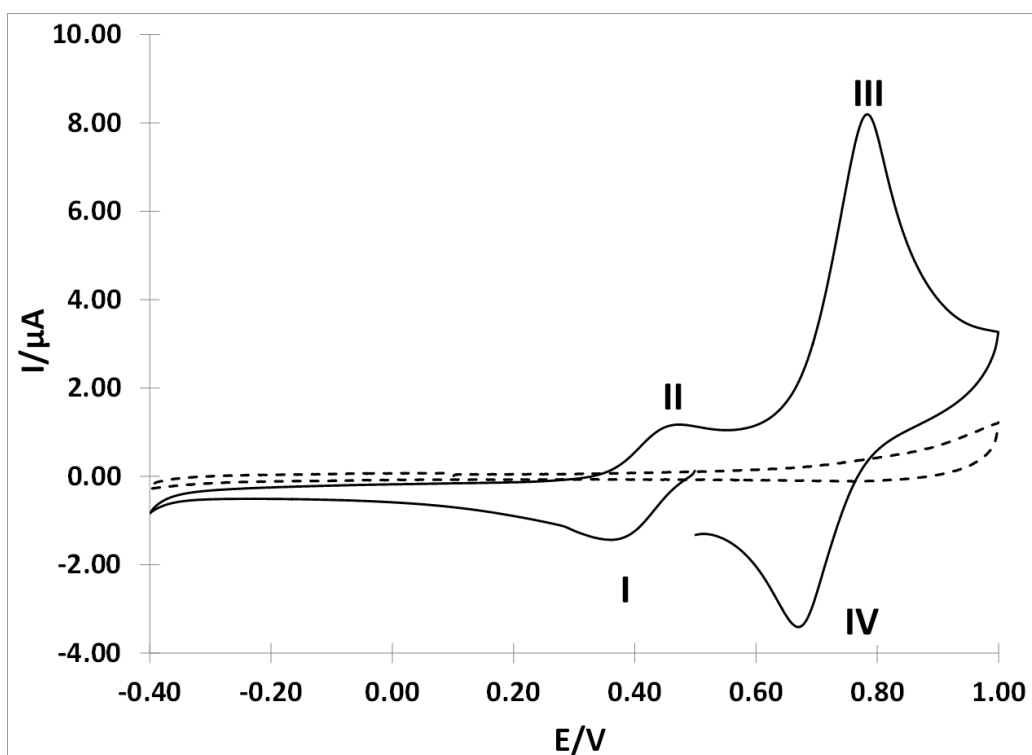
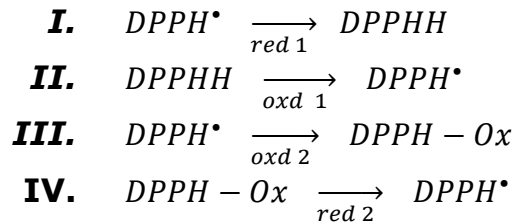


Figura 28. Voltamperograma cíclico del radical DPPH• 80.062 μM (—) y el blanco obtenido (--) en amortiguador de fosfatos 0.1004 M a pH 7 hecho con un electrodo de trabajo de pasta de carbono y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).



A continuación, se muestran las reacciones asociadas a las señales en el proceso que son similares a las obtenidas por Zhuang en un electrodo de grafito para el DPPH• sólido unido a la superficie con parafina.[43]:



En el proceso tiene dos pares redox de los cuales se escoge el primero que corresponde al pico I y II. Sin embargo, al continuar con el procedimiento se observó que el DPPH• se adsorbe en la pasta de carbono lo que impide seguir utilizando el electrodo de pasta de carbono como electrodo de trabajo y se cambió por un electrodo de composite de matriz de grafito-epoxy.



ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL RADICAL DPPH[•] CON UN ELECTRODO DE TRABAJO DE COMPOSITE

Para estudiar la respuesta y comportamiento electroquímico del DPPH[•] se realizan pruebas con un electrodo de composite de matriz de grafito-epoxy en la mezcla 50:50 de etanol con amortiguador de fosfatos pH 7 y amortiguador de acetatos pH 5. Esto con el fin de establecer los parámetros para estudiar posteriormente la reacción entre el Trolox y el radical DPPH[•] con voltamperometría diferencial de pulso (VDP).

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para estudiar el comportamiento electroquímico de la molécula de DPPH[•] en mezclas de etanol con amortiguador de fosfatos 0.1004 M a pH 7 y con amortiguador de acetatos 0.1001 M a pH 5, se obtienen los voltamperogramas cíclicos a una velocidad de barrido de 100 mV/s con un electrodo de trabajo de composite con matriz de grafito y resina epoxy, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl), y un electrodo auxiliar de platino en espiral medido en un potencióstato EPSILON/BASI.

También se estudia el comportamiento del Trolox en una mezcla 50/50 de etanol y amortiguador de fosfatos 0.1004 M por voltamperometría cíclica con las mismas condiciones electrodos que el DPPH[•].

RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 7.

En la figura 29 se presenta el voltamperograma cíclico del DPPH• en la mezcla de etanol con amortiguador de fosfatos pH 7. Se inicia en 0 V hacia valores positivos de potencial donde muestra dos picos de oxidación uno en 0.277 V con corriente de 11.792 μA , y el segundo en 0.827 V con corriente de 32.758 μA . En un potencial de 1 V se hace el barrido hacia potenciales negativos hasta 0 V y se presentan un pico en 0.202 V con corriente de -14.856 μA , y dos hombros uno en un potencial de 0.666 V y el otro en 0.083 V.

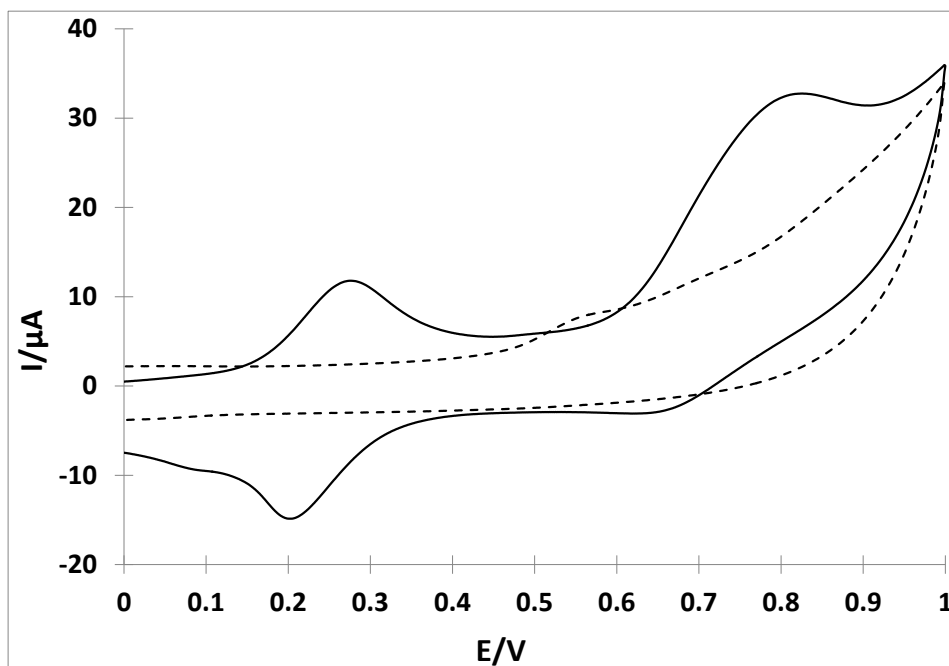


Figura 29. Voltamperograma cíclico del radical DPPH• 80.062 μM (—) y el blanco obtenido (--) en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de fosfatos 0.1004 M a pH 7 hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).

En la mezcla de etanol con amortiguador de fosfatos desaparece el segundo pico de reducción que ya solo aparece como un hombro, sin

embargo, la distancia entre picos es mayor por lo que se define mejor cada uno.

Después se repitió la voltamperometría cíclica del radical pero ahora se recorta la ventana de potencial de 0 a 0.45 V (figura 30). Se observa el primer par redox reversible que muestra a un potencial de pico catódico de 0.213 V con una corriente de $-15.537 \mu\text{A}$, y un pico anódico de 0.292 V con una corriente de $14.316 \mu\text{A}$.

Con el electrodo de composite no se mostró la adsorción del radical y permitió que los experimentos tengan reproducibilidad.

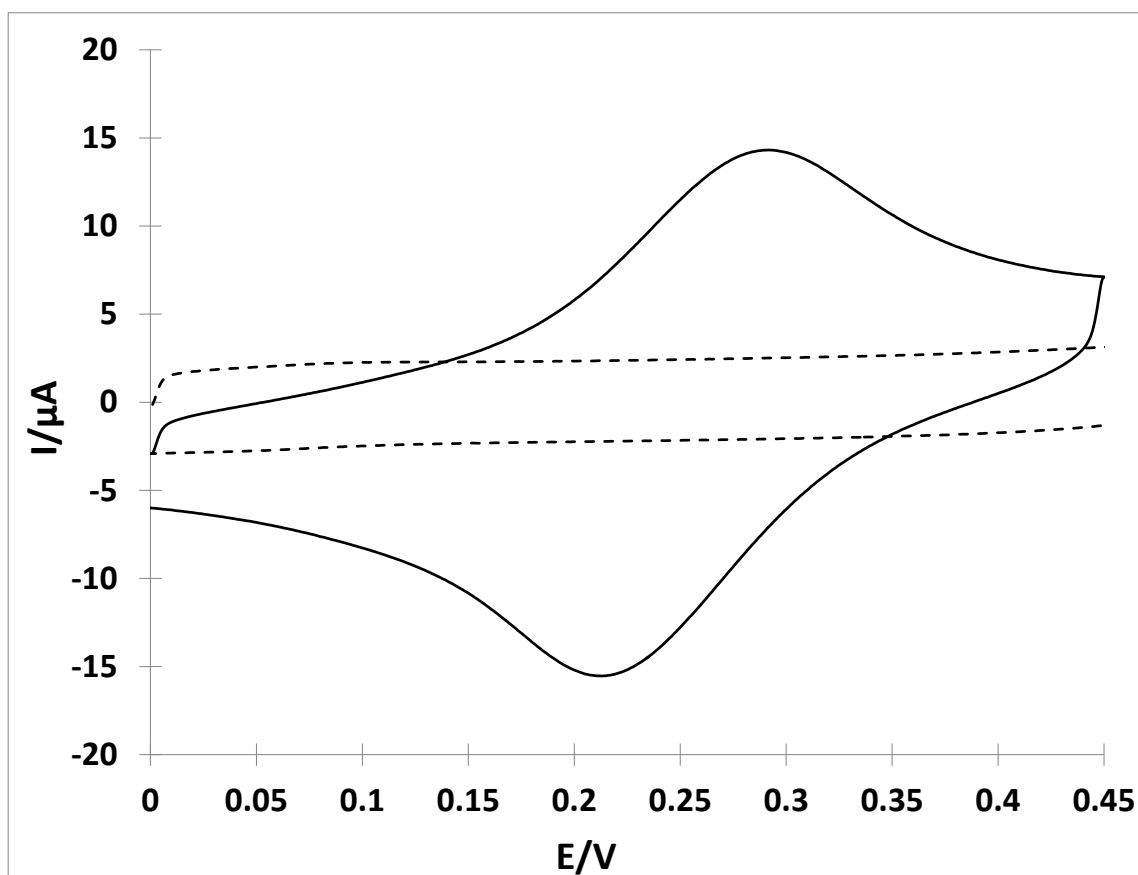


Figura 30. Voltamperograma cíclico del radical DPPH^\bullet $80.062 \mu\text{M}$ (—) y el blanco obtenido (--) en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de fosfatos 0.1004 M a pH 7 hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).

Por otra parte, se obtuvo el voltamperograma cíclico de la molécula de Trolox, y se observa que solo tiene un pico de oxidación irreversible con un potencial de pico de 0.271 V y una corriente de 6.051 μA (figura 31).

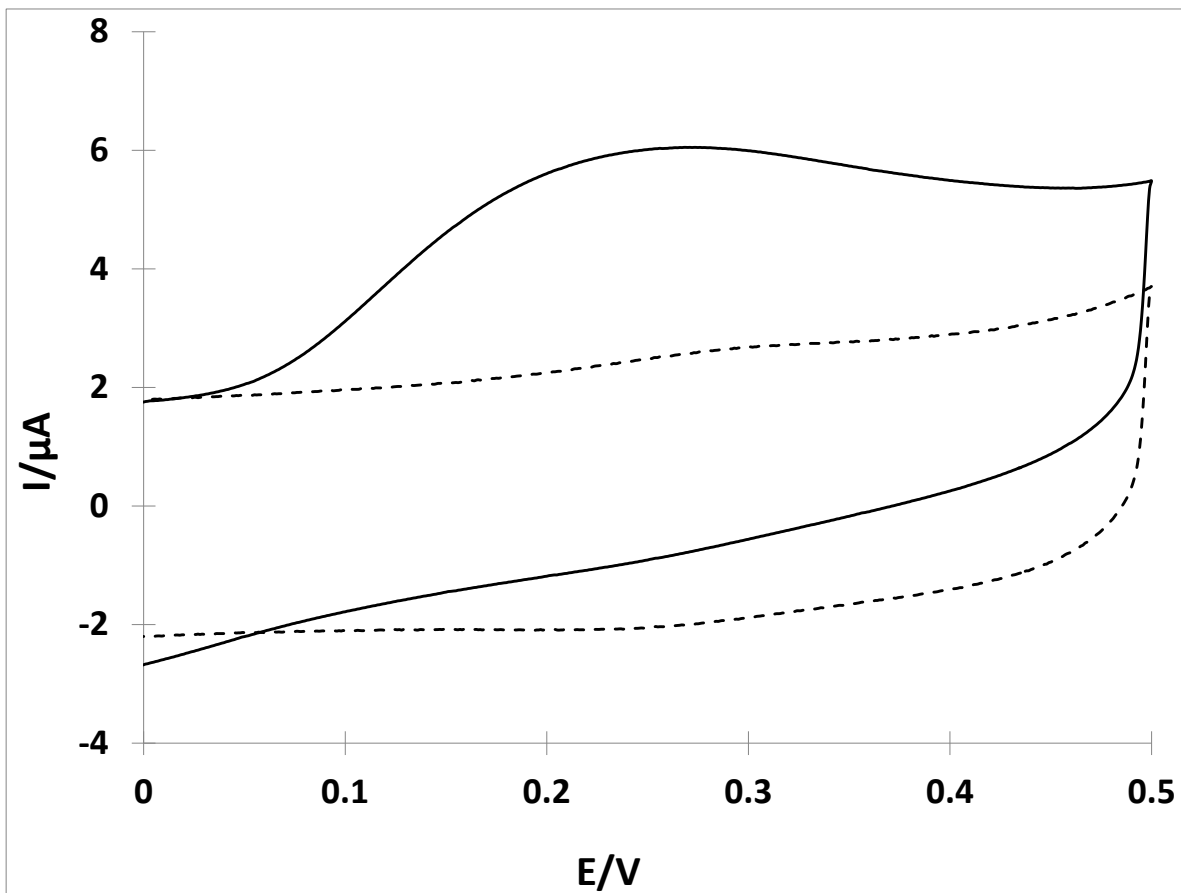


Figura 31. Voltamperograma cíclico del Trolox 86.669 μM (—) y el blanco obtenido (---) en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de fosfatos 0.1004 M a pH 7 hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).

RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE ACETATOS pH 5

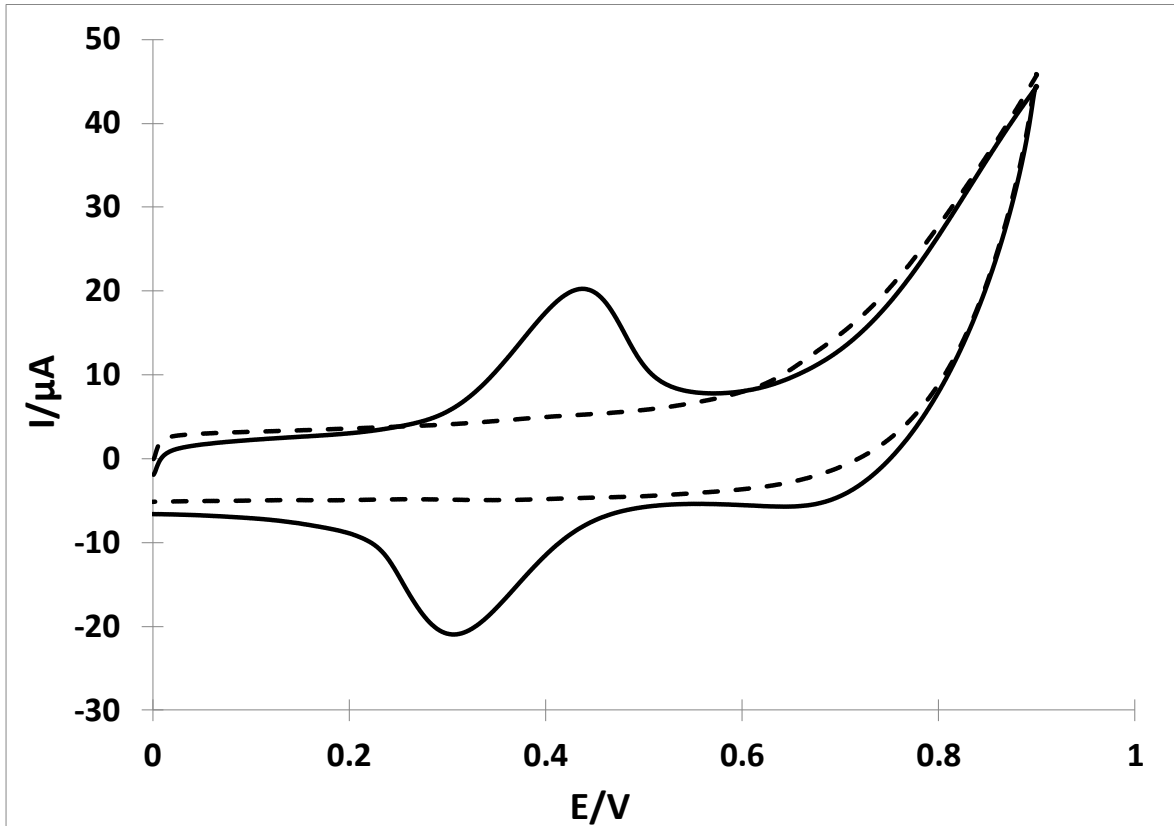


Figura 32. Voltamperograma cíclico del radical DPPH• 80.062 μM (—) y el blanco obtenido (--) en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de acetatos 0.1001 M a pH 5 hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).

Para el voltamperograma cíclico en mezcla de etanol y amortiguador de acetatos a pH 5 se obtuvo el voltamperograma cíclico (figura 32) iniciando el barrido en 0 V hacia potenciales positivos donde se tiene un pico de anódico en un potencial de 0.437 V con una corriente de 20.261 μA . Se sigue hasta 1 V y ahí se invierte el barrido hacia potenciales negativos donde se obtiene ahora un pico catódico en un potencial de 0.307 V y una corriente de -20.951 μA . Se observa que, en este sistema, a diferencia del voltamperograma obtenido en mezcla de etanol y amortiguador de

fosfatos, solo aparece un pico de oxidación y uno de reducción lo que puede deberse a que los picos se desplazan a valores más positivos y además, debido a la electrolisis del agua este segundo pico de oxidación y su pico de reducción no son observables.

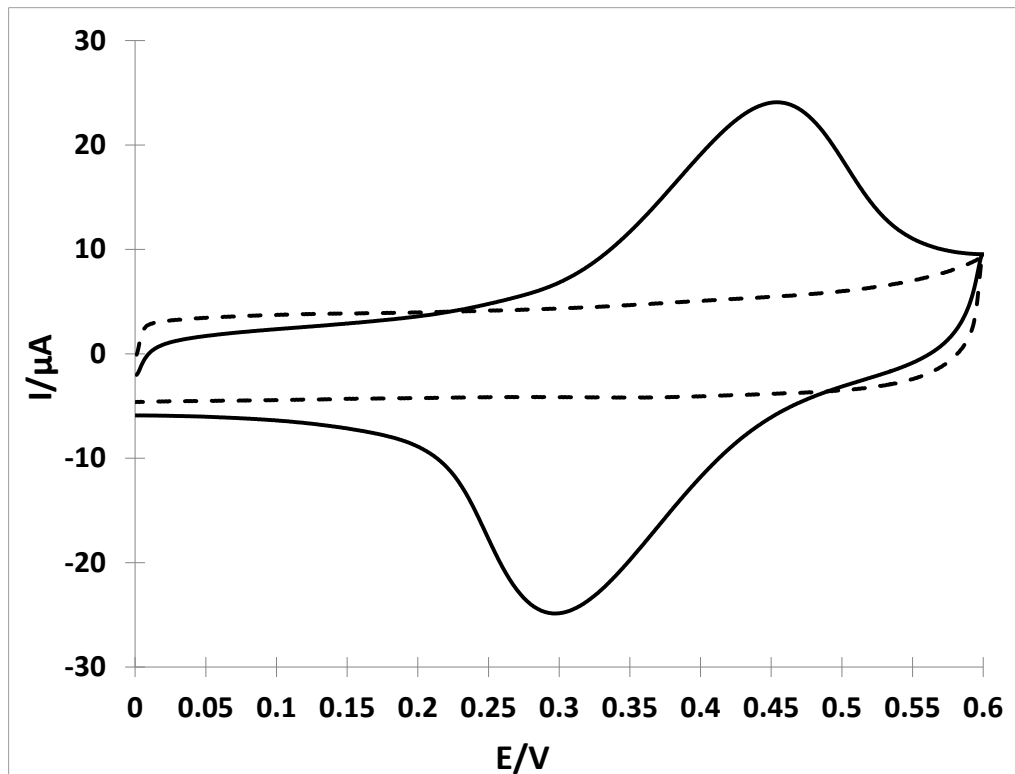


Figura 33. Voltamperograma cíclico del radical DPPH• 80.062 μM (—) y el blanco obtenido (--) en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de acetatos 0.1001 M a pH 5 hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).

Se repite el voltamperograma cíclico en mezcla de etanol AAC a pH 5 (figura 33) iniciando el barrido en 0 V hacia potenciales positivos donde se tiene un pico de anódico en un potencial de 0.454 V con una corriente de 24.097 μA . Se sigue hasta 0.6 V y ahí se invierte el barrido hacia potenciales negativos donde se obtiene ahora un pico catódico en un potencial de 0.297 V y una corriente de -24.872 μA .



Una vez que se encontraron los potenciales de reducción y oxidación del DPPH• se elige el pico de oxidación del radical para seguirlo en el estudio de la reacción del DPPH• con el Trolox. Como se observó en el voltamperograma cíclico del Trolox, éste reacciona por completo con el radical DPPH• desapareciendo su pico de oxidación y no interfiriendo con el primer pico anódico del DPPH•.

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA REACCIÓN ENTRE TROLOX Y EL RADICAL DPPH•

Ya establecidos el potencial de oxidación del radical DPPH• se estudia por VDP la reacción entre el Trolox y el radical DPPH• en una mezcla de etanol:agua 50:50 a diferentes valores pH. Y posteriormente desarrollar un método electroquímico para determinar la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

Ésto se hará siguiendo los cambios de la corriente de pico de oxidación (i_p) del DPPH•, ya que la i_p se relaciona directamente con la concentración de DPPH• en celda, así que cuando el radical reacciona con el Trolox el cambio de la i_p se puede relacionar a su vez con la concentración de Trolox que ha reaccionado con el DPPH•. Lo que permitirá la construcción de una curva de calibración de i_p del DPPH• contra la concentración de Trolox añadida en la celda.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para monitorear la reacción del DPPH• con Trolox se añaden diferentes alícuotas de Trolox que van de 5 a 50 μM se obtienen voltamperogramas diferenciales de pulso de la solución con el DPPH• una vez que ha reaccionado con el Trolox (transcurridos 5 minutos) en un intervalo de 0 a 0.450 V. A partir de estos gráficos se construyen curvas de calibración de la corriente de pico de oxidación del DPPH• contra la concentración de Trolox añadida.

Se utiliza un electrodo de trabajo de composite de matriz de grafito con resina epoxy, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3 M) y un electrodo auxiliar de platino en espiral, midiendo con un potenciostato EPSILON/BAS.

RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS pH 7

La voltamperometría diferencial de pulso del radical DPPH• se inicia el barrido en un potencial de 0 V hasta 0.45 V. El radical presenta un máximo en un potencial de 0.244 V.

En la figura 34 se observa que existe un desplazamiento hacia potenciales más positivos del máximo del pico y la corriente disminuye según se aumenta la concentración de Trolox reaccionando con el radical. Esta disminución de corriente es proporcional a la concentración de Trolox. Construyendo así una curva de calibración de corriente de pico contra la concentración de Trolox, con un coeficiente de correlación lineal de 0.996 y una sensibilidad de $0.0999 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ (figura 35).

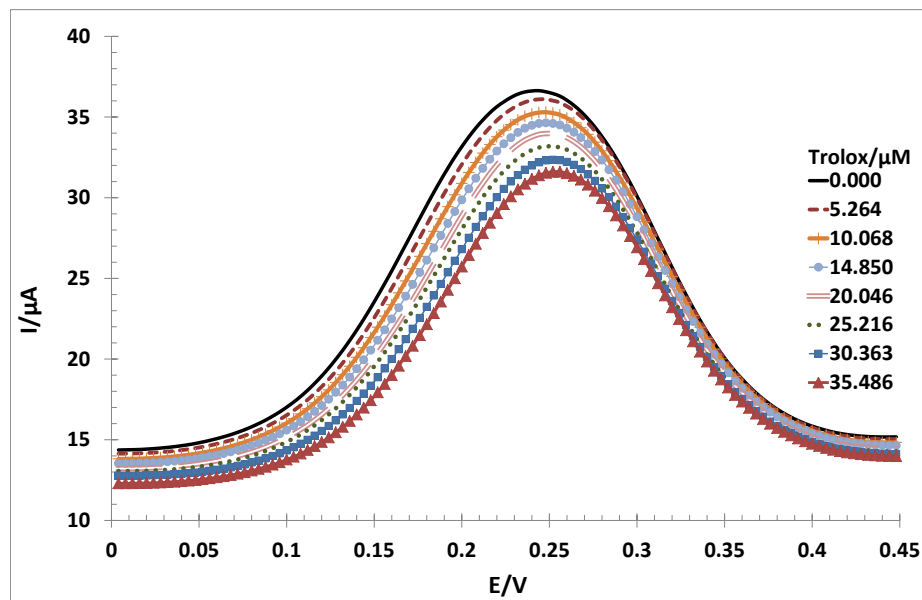


Figura 34. Voltamperogramas diferenciales de pulso del radical DPPH• $100.208 \mu\text{M}$ (—) y con diferentes adiciones de Trolox en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de fosfatos 0.1004 M a pH 7; hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).

La linealidad de la curva de la figura 28 se conserva hasta una concentración de $35 \mu\text{M}$ de Trolox. En la literatura se reporta una



estequiometría de dos moléculas de DPPH• por una de Trolox en etanol, sin embargo, con este método cambia esta razón.

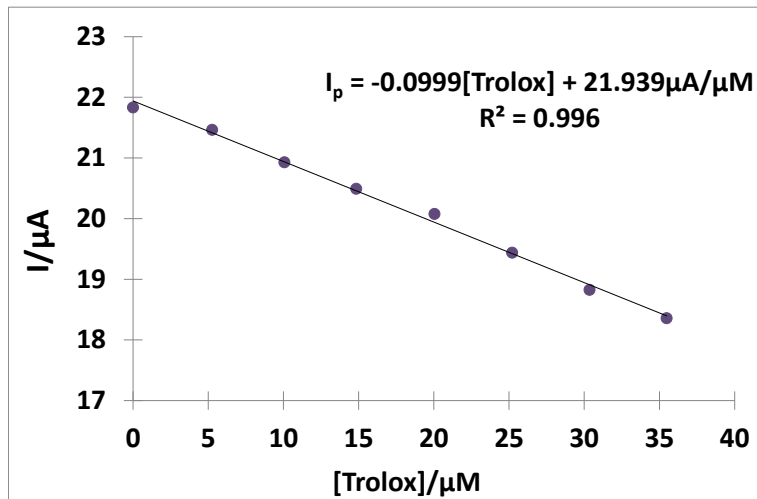


Figura 35. Gráfico de Corriente de pico obtenida de voltamperometría diferencial de pulso contra la concentración de Trolox añadida en amortiguador de fosfatos pH 7 y etanol 50:50 (v/v).

RESULTADOS EN AMORTIGUADOR DE ACETATOS pH 5

Para VDP del radical DPPH[•] en mezcla 50:50 de etanol y amortiguador de acetatos pH 5 se inicia el barrido en 0.1 V hacia potenciales positivos donde se obtiene un pico de oxidación en 0.268 V. A medida que se añaden alícuotas de Trolox y éste reacciona con el radical la corriente disminuye y los potenciales de pico se desplazan hacia valores más positivos como se observa en la figura 36. Desplazando el máximo de 368 hasta 372 mV.

Vemos que existe un desplazamiento hacia potenciales más positivos del máximo del pico y la corriente disminuye según se aumente la concentración de Trolox reaccionando con el radical. Esta disminución de corriente es proporcional a la concentración de Trolox.

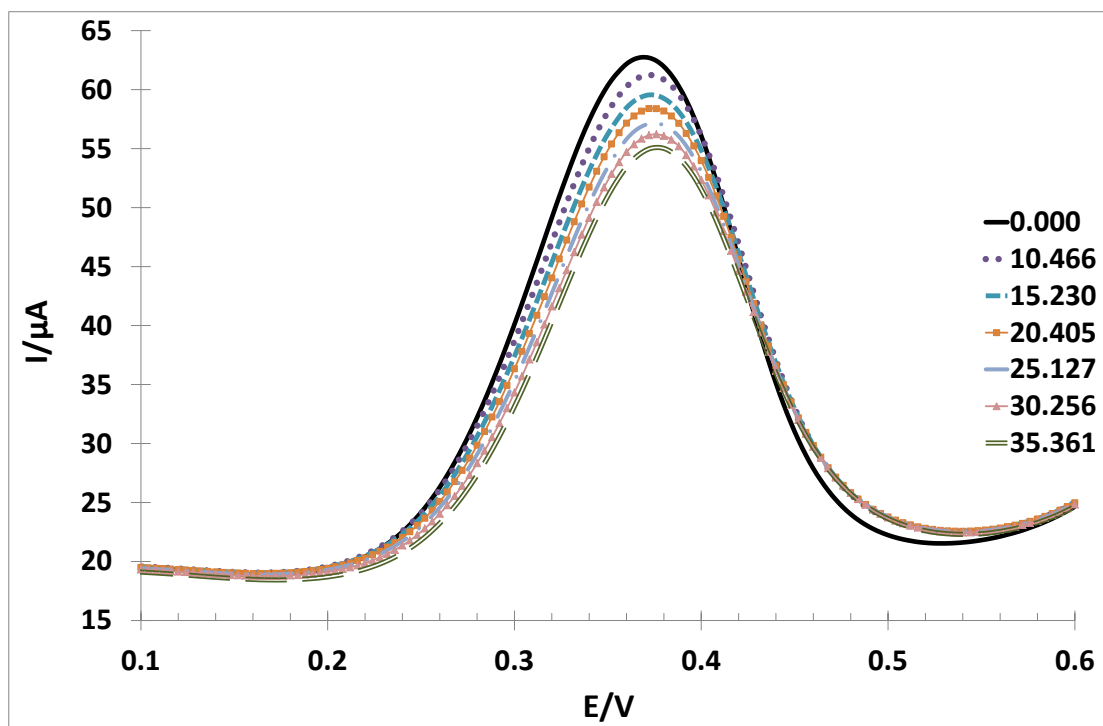


Figura 36. Voltamperogramas diferencial de pulso del radical DPPH[•] 100.208 μM (—) con diferentes adiciones de Trolox en una solución 50:50 de etanol y amortiguador de acetatos 0.1001 M a pH 5; hecho con un electrodo de trabajo de composite (matriz de grafito y resina epoxy) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M KCl).



Siguiendo la corriente de pico de los voltamperogramas obtenidos se construye una curva de corriente contra la concentración de Trolox añadida a la celda (figura 37). Lo que nos da un valor de R^2 de 0.9916 y una sensibilidad de $0.2317 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$.

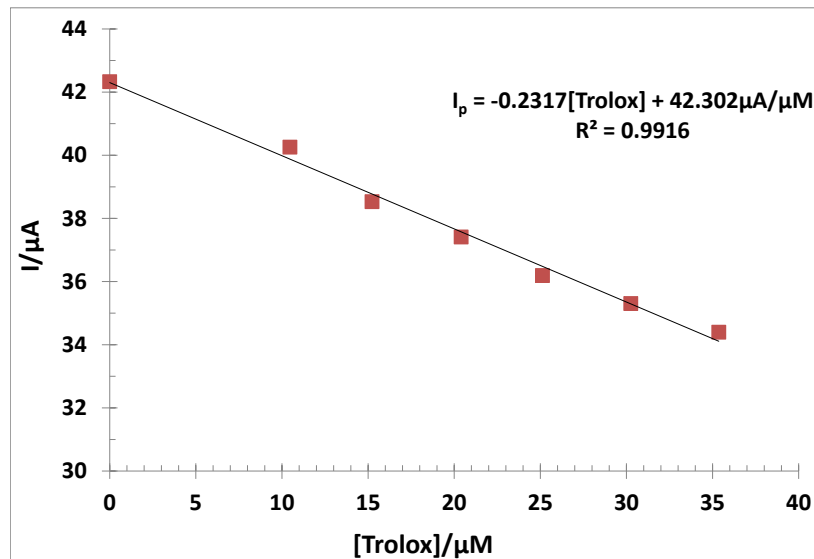


Figura 37. Gráfico de Corriente de pico obtenida de voltamperometría diferencial de pulso contra la concentración de Trolox añadida en amortiguador de acetatos pH 5 y etanol 50:50.

De ambos sistemas, el que presentó una mejor sensibilidad y respuesta lineal en la curva de calibración fue el que se estudió en la mezcla de etanol y amortiguador de acetatos 50:50 por lo que se propone para determinar CAET en muestras antioxidantes.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CAPÍTULO 6



CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusiones se puede decir que en el DPPH• es estable en las mezclas de etanol-solución acuosa en los porcentajes del 90 al 40 % de contenido de volumen de etanol, ya sea con solución amortiguadora de fosfatos a pH 7 o solución amortiguadora de acetatos a pH 5.

Para la evaluación de la reacción de Trolox con DPPH• se observa que en presencia de los amortiguadores de Fosfatos y Tris a pH 7 y 8 respectivamente, la reacción es desfavorecida al degradarse con mayor rapidez el DPPH• cambiando la estequiometría 2:1 de la reacción DPPH• y Trolox. Además, en estos medios aparece una banda de absorción a 418 nm para el amortiguador de fosfatos y otra en 408 nm con el amortiguador Tris, bandas que son atribuidas a la desprotonación de la especie reducida del radical DPPH-H.

En las mezclas con el amortiguador de acetatos a pH 5 tiene un comportamiento similar a cuando la reacción se lleva en medio etanólico. La mezcla 50:50 (v/v) resulta hasta el momento la más favorable para la reacción de Trolox con DPPH• al tener la mejor pendiente y una correlación mayor a 0.99 y no presentar la banda interferente a 408 nm.

El DPPH• presenta respuesta electroquímica en los sistemas estudiados con las mezclas de etanol con amortiguador de fosfatos o amortiguador de acetatos con el electrodo de composite. En AF presenta dos señales de oxidación y dos señales de reducción.

A diferencia de con AAc que solo presenta una señal en oxidación y otra en reducción, lo que puede deberse a que los picos se desplazan a valores más positivos y debido a la electrolisis del agua este segundo pico de oxidación y su pico de reducción no son observables. Por lo tanto el primer



par redox presenta mayor reproducibilidad por lo que se elige la señal anódica para realizar el estudio de DPPH• y Trolox con VDP.

En el estudio de la reacción de DPPH• y Trolox en etanol con amortiguador de acetatos se tiene una mayor sensibilidad al comprar la curva de calibración con la obtenida para la mezcla con fosfatos. Para ambos la linealidad se conserva hasta una concentración de 35 μ M de Trolox.

El método de VDP es viable para detectar los cambios de la corriente del DPPH• cuando reacciona con el Trolox. Ya que se encontró una buena respuesta lineal y sensibilidad al seguir la reacción del DPPH• y Trolox electroquímicamente. Lo cual nos permite proponerlo como un buen método para la determinación de actividad antioxidante con el radical DPPH• Además al realizarlo en una mezcla de etanol-solución acuosa se puede controlar de mejor forma las condiciones experimentales y a diferencia del método espectroscópico se evitarán interferencias causadas por soluciones coloridas que puedan llevar a datos erróneos.

Como perspectivas a futuro se propone hacer pruebas a diferentes antioxidantes y comparar los resultados obtenidos con distintos métodos para determinar capacidad antioxidante.

ANEXO 1: EQUIPO Y REACTIVOS

REACTIVOS Y SOLUCIONES

El DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), el Trolox 97% (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchromanol-2-carboxílico) y etanol Chromasolv fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH. El Hidróxido de Potasio 85% se obtuvo por Merck. El Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4), el Acetato de Sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), el ácido clorhídrico 36.5% (HCl), el ácido fosfórico 85.2% (H_3PO_4), el ácido gálico 98% ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) y el ácido cafeico 95% ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$) se obtuvieron por Baker Analyzed y el ácido acético glacial (CH_3COOH) 99.7% por Laboratorios Laitz, S.A. de C.V. El Tris-(hydroxymetil)-aminometano 99.8% fue adquirido por FLUKA. El Hidróxido de Sodio (NaOH) se obtuvo por MACRON.

Todos los reactivos usados son grado analítico y se usó agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) para todas las disoluciones.

Se prepararon soluciones de DPPH• $2 \times 10^{-3} \text{ M}$, y de Trolox $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ disolviendo cada compuesto en etanol. Ambas disoluciones se mantenían en hielo, protegidas de la luz y eran usadas el mismo día de su preparación.

La solución amortiguadora de fosfatos $(2.012 \pm 0.016) \times 10^{-3} \text{ M}$ se preparó disolviendo KH_2PO_4 en agua y el pH 7.0 se ajustó con una solución $(0.11145 \pm 0.0005) \text{ M}$ de KOH .

La solución amortiguadora de acetatos $(5.203 \pm 0.231) \times 10^{-3} \text{ M}$ se preparó disolviendo acetato de sodio y ácido acético glacial en agua. El pH 5.0 se ajustó con NaOH $(0.1025 \pm 0.0004) \text{ M}$.



La solución amortiguadora de Tris (5.053 ± 0.020) $\times 10^{-3}$ M se preparó disolviendo Tris(hydroxymetil)aminometano en agua. El pH 8.0 se ajustó con ácido clorhídrico (0.1053 ± 0.0008) M.

La solución amortiguadora Britton-Robinson 0.09985 M se preparó disolviendo ácido acético, ácido fosfórico y ácido bórico en agua. Se ajustó a pH 4 con NaOH (0.1025 ± 0.0004) M.

Todas las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno por 30 minutos.

EQUIPOS DE TRABAJO

Se usó un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 20. El pH de las disoluciones se ajustó empleando un pH-metro Mettler Toledo MP230. Todos los experimentos electroquímicos se hicieron en un potenciostato EPSILON-BASI en una celda electroquímica estándar de tres electrodos con capacidad de 10 mL. Se utiliza un electrodo auxiliar de alambre de platino, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3M KCl), y un electrodo de pasta de carbono o un electrodo de composite como electrodos de trabajo.

La temperatura de trabajo se ajustó por medio de un baño termostatado en 15 °C.

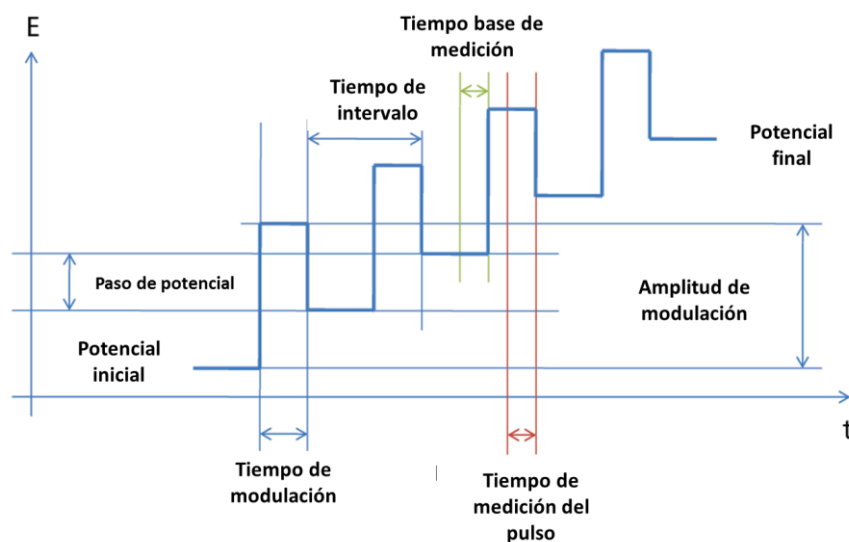


ANEXO 2: TÉCNICA DE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO

En esta técnica se realiza un barrido de potencial, en cada paso de potencial dado se aplica un pulso, con una amplitud definida, en el que se mide la corriente antes de ser aplicado y después del mismo. La corriente se resta y el grafico de la diferencia da como resultado una curva bien definida.

Este método mejora el límite de detección. Ya que la amplitud de modulación aplicada es constante, la corriente capacitiva contribuida se verá reflejada en una línea base constante. Además, las especies reducidas u oxidadas aparecerán en picos muy definidos.

Se pueden alcanzar límites de detección de hasta 10^{-8} M, se debe tener cuidado ya que con esto aumenta la posibilidad de encontrarse con un fenómeno irreversible. Lo segundo puede detectarse por un cambio en el pico hacia potenciales más negativos (reducción) o más positivos (oxidación), además de una reducción en el pico con una modulación del tiempo decreciente.





REFERENCIAS

1. Namiki, M., *Antioxidants/antimutagens in food*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1990. **29**(4): p. 273-300.
2. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(1): p. 44-84.
3. Ames, B.N., L.S. Gold, and W.C. Willett, *The causes and prevention of cancer*. Journal Name: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; Journal Volume: 92; Journal Issue: 12; Other Information: PBD: 6 Jun 1995, 1995: p. Medium: X; Size: pp. 5258-5265.
4. Blasco, A.J., et al., *Direct Electrochemical Sensing and Detection of Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity in Vitro Systems*. Electroanalysis, 2007. **19**(22): p. 2275-2286.
5. Gorjanović, S., et al., *Electrochemical versus Spectrophotometric Assessment of Antioxidant Activity of Hop (*Humulus lupulus* L.) Products and Individual Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(38): p. 9089-9096.
6. Lino, F.M.A., et al., *Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines*. Electrochimica Acta, 2014. **128**: p. 25-31.
7. Qiu, J., et al., *Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS methods*. Food Chemistry, 2012. **135**(4): p. 2366-2371.
8. Zhang, Y., et al., *Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC-DPPH assay*. Food Research International, 2013. **53**(2): p. 847-856.
9. Deng, J., W. Cheng, and G. Yang, *A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay*. Food Chemistry, 2011. **125**(4): p. 1430-1435.
10. Garewal, H., ed. *Antioxidants and disease prevention*. Vol. 14. 1997, CRC Press. 186.
11. Ibarra-Escutia, P., et al., *Amperometric biosensor based on a high resolution photopolymer deposited onto a screen-printed electrode for phenolic compounds monitoring in tea infusions*. Talanta, 2010. **81**(4-5): p. 1636-1642.
12. Sanchez-Moreno, C., *Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems*. Food Science and Technology International, 2002. **8**(3): p. 121-137.
13. Forrester, A.R., J.M. Hay, and R.H. Thomson, *Organic chemistry of stable free radicals*. 1968: Academic Press New York.
14. Hay, J.M., *Reactive free radicals*. 1974, London, New York,: Academic Press. viii, 158 p.
15. Fossey, J., D. Lefort, and J. Sorba, *Free radicals in organic chemistry*. 1995, New York: Wiley; Masson. xiv, 307 p.
16. *Antioxidant*, in *Webster's Third New International Dictionary, Unabridged* Merriam-Webster, Editor. 2002.
17. Ho, C.-T. and F. Shahidi, eds. *Antioxidant Measurement and Applications*. ed. A.S. Series. 2007: United States of America. 455.
18. Halliwell, B., *How to Characterize a Biological Antioxidant*. Free Radical Research Communications, 1990. **9**(1): p. 1-32.
19. Valgimigli, L. and D. Pratt, *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, C. Chatgililoglu and A. Studer, Editors. 2012, John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK.



20. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
21. van den Berg, R., et al., *Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures*. Food Chemistry, 1999. **66**(4): p. 511-517.
22. Blois, M.S., *Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical*. Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199-1200.
23. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
24. Villaño, D., et al., *Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical*. Talanta, 2007. **71**(1): p. 230-235.
25. Rice-Evans, C. and N.J. Miller, *Total antioxidant status in plasma and body fluids*. Methods in enzymology, 1994. **234**: p. 279-293.
26. Hyde, J.S., R.C. Sneed, and G.H. Rist, *Frequency - Swept Electron-Electron Double Resonance: DPPH in Liquid and Frozen Solution*. The Journal of Chemical Physics, 1969. **51**(4): p. 1404-1416.
27. Yordanov, N.D., *Is our knowledge about the chemical and physical properties of DPPH enough to consider it as a primary standard for quantitative EPR spectrometry*. Applied Magnetic Resonance, 1996. **10**(1-3): p. 339-350.
28. Valgimigli, L., K.U. Ingold, and J. Lusztyk, *Solvent Effects on the Reactivity and Free Spin Distribution of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radicals*. The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(22): p. 7947-7950.
29. Bandonienè, D., et al., *Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods*. European Food Research and Technology, 2014. **214**(2): p. 143-147.
30. Yordanov, N.D. and A.G. Christova, *Quantitative spectrophotometric and EPR-determination of 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 1997. **358**(5): p. 610-613.
31. Ahmed, S., et al., *A Facile Electrochemical Analysis to Determine Antioxidant Activity of Flavonoids against DPPH Radical*. Journal of The Electrochemical Society, 2012. **159**(5): p. F103-F109.
32. Ozcelik, B., J.H. Lee, and D.B. Min, *Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*. Journal of Food Science, 2003. **68**(2): p. 487-490.
33. Foti, M.C., *Use and Abuse of the DPPH•Radical*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(40): p. 8765-8776.
34. Scott, J.W., et al., *6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: Novel antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1974. **51**(5): p. 200-203.
35. Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science, 1997. **2**(4): p. 152-159.
36. Iuliano, L., et al., *Protection of low density lipoprotein oxidation by the antioxidant agent IRF1005, a new synthetic hydrophilic vitamin E analogue*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(7-8): p. 858-868.
37. Friaa, O. and D. Brault, *Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox? and the free radical DPPH? in semi-aqueous solution*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2006. **4**(12): p. 2417.



38. Ibarra-Escutia, P., *Determinación del contenido fenólico en extractos naturales mediante sensores enzimáticos.*, in *Química Análítica*. 2010, Universidad Autónoma Metropolitana: México, D.F.
39. Miller, N.J. and M.B. Ruiz-Larrea, *Flavonoids and Other Plant Phenols in the Diet: Their Significance as Antioxidants*. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 2002. **12**(1): p. 39-51.
40. Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998. **76**(2): p. 270-276.
41. Solon, E. and A.J. Bard, *The Electrochemistry of Diphenylpicrylhydrazyl*. *Journal of the American Chemical Society*, 1964. **86**(10): p. 1926-1928.
42. Hall, D.A. and P.J. Elving, *Voltammetry without background electrolyte: Redox pattern of DPPH in non-aqueous media*. *Electrochimica Acta*, 1967. **12**(9): p. 1363-1375.
43. Zhuang, Q.-k., F. Scholz, and F. Pragst, *The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles*. *Electrochemistry Communications*, 1999. **1**(9): p. 406-410.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00064

Matrícula: 2131800301

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO
PARA LA DETERMINACIÓN DE
LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
UTILIZANDO DPPH• EN
MEZCLAS ETANOL-AGUA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 7 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ
DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL
DR. PEDRO IBARRA ESCUTIA



GLORIA ALEJANDRA MENDEZ RIVERA
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: GLORIA ALEJANDRA MENDEZ RIVERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

a probar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARANSASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

VOCAL

DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL

SECRETARIO

DR. PEDRO IBARRA ESCUTIA