

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



**“Síntesis, Caracterización Estructural y Actividad
Antioxidante del Tiotungstato de
Alquiltrimetilamonio”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO HORTA MARRÓN

DIRECTORES DE TESIS
DR. JUAN CRUZ REYES
DRA. LILIAN BEATRIZ ROMERO SANCHEZ

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

JUNIO 2019

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 034

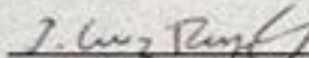
Tijuana, B. C., a 11 de abril de 2019

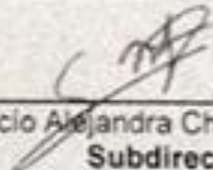
C. Jose Francisco Horta Marron
Pasante de Químico Industrial
Presente


El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Juan Cruz Reyes y la Dra. Lilian Beatriz Romero Sánchez quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Síntesis, Caracterización Estructural y Actividad Antioxidante del Tiotungstato de Alquiltrimetilamonio", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS


Dr. Juan Cruz Reyes
Dra. Lilian Beatriz Romero Sánchez
Directores de Tesis


Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy
Subdirectora


Dr. José Luis González Vázquez
Director Provisional



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis el Dr. Juan Cruz Reyes y la Dra. Lilian Beatriz Romero Sánchez (Laboratorio de Catálisis, UABC), por su gran apoyo y constante contribución en mi formación profesional y mi crecimiento personal, por su amistad y su confianza que fueron vitales para la realización y la culminación de este trabajo.

También, quiero agradecer al Dr. Iván Córdova Guerrero y la Dra. Laura Díaz Rubio, por ser valiosos colaboradores en la elaboración de este trabajo, además de brindarme su apoyo y la bienvenida al laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, (UABC).

Asimismo, mi más profundo agradecimiento a mi alma mater la Universidad Autónoma de Baja California, por brindarme apoyo a lo largo de 4 años con herramientas necesarias para mi aprendizaje. Quiero agradecer al Dr. Mario del Valle por su peculiar forma de revelarnos la ciencia y a mis maestros que me han acompañado a lo largo de mi formación académica profesional, por su invaluable dedicación a la enseñanza.

Gracias al Dr. Luis Enrique Palafox Maestre y al Dr. José Luis González Vázquez por el financiamiento para la proyección de este trabajo y las facilidades otorgadas por la Dirección de la Facultad Ciencias Químicas e Ingeniería.

De la manera más atenta extiendo mi agradecimiento y mi reconocimiento al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, por el apoyo brindado.

Debo un reconocimiento especial a mis compañeros que me acompañaron a lo largo de mi carrera, a mi roomie Daniel, por su grata compañía y amistad durante poco más de 4 años y a mis amigos dentro del laboratorio de Catálisis Heterogénea, Karla y Raúl, gracias por su compañía en todo este proceso, por los chismes, por los chistes y por sus consejos para la elaboración de esta tesis.

De manera especial, quiero expresar mi sincera gratitud a Salma, que a lo largo de este trabajo ha sido fuente vital de motivación para mi persona. No hay palabras

que alcancen a describir mi gratitud hacia ti, tus consejos y tu singular compañía fue pieza clave para batir cada meta. Gracias por ser mi equipo en Brasil, mi alegría en Argentina y mi todo en México. Tú me vuelves de entre todos el más feliz.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia y de manera muy particular, a la persona a quien dedico esta tesis, a mi papá. Él, a pesar de no estar presente en cuerpo, siempre me ha acompañado en el alma, para ti un abrazo hasta el cielo. Lo logramos, Capi.

RESUMEN

Un área de investigación emergente en el campo del estrés oxidativo es el uso de fármacos inorgánicos, que poseen propiedades redox y actúan de manera efectiva en la eliminación de radicales libres.

Se encontró en la literatura que algunas tiosales de amonio, como el tetratiomolibdato de amonio (TMA), tienen propiedades que lo vuelven un compuesto anticanceroso, antiangiogénico, antioxidante, antiinflamatorio y además ha sido probado como medicamento quelante de cobre.

Aunque la actividad biológica del TMA sugiere que especies inorgánicas relacionadas, tales como las sales de tiotungstato, pueden mostrar un comportamiento análogo, no se ha evaluado la actividad biológica de las tiosales de tiotungstato.

En este trabajo, se sintetizó tiotungstato de amonio (TTA), se caracterizó y se evaluó su actividad antioxidante. Además, se incorporaron diferentes cadenas de alquilo en la molécula TTA y se evaluó la influencia del carbono en la actividad biológica.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
I. 1.	Radicales libres.....	2
I. 2.	Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	2
I. 3.	Terapia antioxidante.....	4
I. 4.	Evaluación de la actividad antioxidante.....	5
I.4.1.	Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).....	7
I.4.2.	Ensayo ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).....	8
II.	ANTECEDENTES.....	9
II. 1.	Tiometalatos de amonio.....	9
II. 2.	Actividad biológica de los Tiometalatos (Mo/W) de amonio.....	10
II.3.	Hipótesis.....	13
II.4	Objetivos.....	14
II.4.1.	Objetivos específicos.....	14
III.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	15
III.1.	Reactivos.....	15
III.2.	Síntesis del precursor tiotungstato de amonio (TTA).....	15
III.3.	Síntesis de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio.....	17
III.3.1.	Síntesis del tiotungstato de octiltrimetilamonio (TOctilTTA).....	18
III.3.2.	Síntesis de los tiotungstatos de dodeciltrimetilamonio (TDodecilTTA) y hexadeciltrimetilamonio (THexadecilTTA).....	18
III.4.	Recuperación de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio sintetizados.....	19
III.5.	Caracterización.....	20
III.5.1.	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)....	20
III.5.2.	Espectroscopía UV-vis.....	21
III.6.	Determinación de la Actividad Antioxidante.....	21
III.6.1.	Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).....	22
III.6.2.	Ensayo ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).....	24

III.6.3. Expresión de los resultados para la actividad antioxidante.....	26
III.6.3.1. Ensayo DPPH.....	26
III.6.3.2. Ensayo ABTS.....	26
III.6.3.3. Expresión de la IC ₅₀	27
III.7. Análisis Estadístico.....	27
III.7.1. Prueba t-Student.....	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
IV.1. Caracterización del TTA y los TTA modificados sintetizados.....	29
IV.1.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	29
IV.1.2. Espectrometría UV-vis.....	32
IV.3. Determinación de la Actividad Antioxidante.....	33
IV.3.1. Técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinación de la actividad antioxidante.....	33
IV.3.2. Técnica ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) para determinación de la actividad antioxidante.....	36
V. CONCLUSIONES.....	39
VI. REFERENCIAS.....	40
VII. ANEXOS.....	44

I. INTRODUCCIÓN

El oxígeno es un elemento esencial para el desarrollo de la vida aerobia, pero también posee efectos tóxicos inherentes a su estructura. Los seres humanos necesitan oxígeno (O_2) para la producción de energía metabólica mediante reacciones de óxido-reducción (redox) que generan moléculas inestables denominadas radicales libres que pueden causar daño a nivel celular. Para contrarrestar esto, la célula cuenta con un complejo sistema antioxidante encargado de mantener un equilibrio celular estable y un sistema redox regulado para la supervivencia celular (Li, J. *et al.* 2013).

El desequilibrio entre la producción de los radicales libres y la defensa antioxidante provoca un daño celular que pueden afectar uno o varios de los componentes esenciales de la célula, oxidándolos y alterando sus funciones (Ilustración 1). Esta lesión oxidativa, conocida como estrés oxidativo, está implicada en los mecanismos patogénicos de muchas enfermedades crónicas que incluye patologías cardiovasculares, tumorales y neurodegenerativas (Elejalde, J.I. 2001).

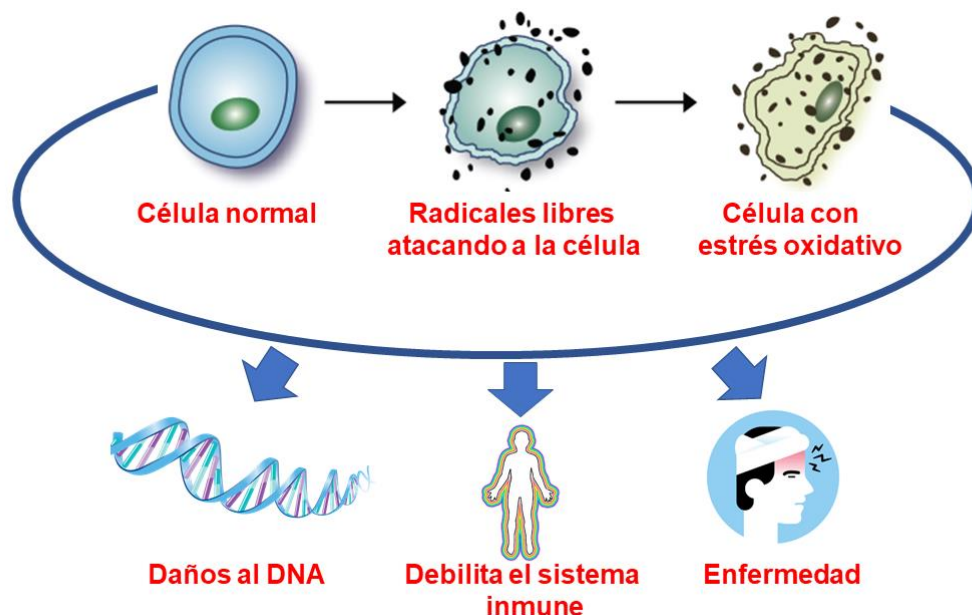


Ilustración 1.- Diagrama del proceso denominado estrés oxidativo. El exceso de radicales libres ataca a la célula produciendo una lesión celular oxidativa que está involucrada en la etiopatogenia de algunas enfermedades de gran importancia en la población como la arteroesclerosis, el cáncer, la hipertensión arterial y la diabetes.

I.1. Radicales libres

Durante los procesos metabólicos, el O₂ se comporta como un aceptor terminal de cuatro electrones y pasa por varias etapas hasta transformarse en agua, que es un producto químico estable. Sin embargo, en condiciones normales la reducción de electrones en el O₂ es incompleta y se producen productos químicos intermedios, entre ellos los radicales libres derivados del oxígeno (ROS, por *radical oxygen species*).

Un radical libre es todo compuesto químico que presente un electrón desapareado en un orbital externo en su estructura atómica y en consecuencia sea una molécula inestable y altamente reactiva. Los radicales libres se originan en fuentes metabólicas endógenas o por fuentes externas y causan la oxidación y peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y la despolimerización de polisacáridos. Además, alteran el ácido desoxirribonucleico, (DNA, por *deoxyribonucleic acid*) rompen las membranas celulares, inactivan enzimas, interfieren con la inmunogenicidad, provocan carcinogénesis y están implicados en proceso de inflamación e hipoxia de los tejidos.

I.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS participan en diversas funciones en el organismo, así como en procesos celulares como la señalización para la generación de hormonas, insulina, citosinas entre otras (Bartozs, G. 2009). En concentraciones elevadas, estas moléculas pueden generar daños graves en el organismo induciendo el estrés oxidativo causante de muerte celular y generador de diversas patologías (Halliwell, B. *et al.* 1999).

Las principales ROS en estado radical son el ión superóxido (O₂^{*-}), el radical hidroxilo (*OH), los alcoxilo (RO*), el peroxilo (ROO*) y el óxido de nitrógeno (NO*). De las ROS más importantes para la fisiología humana se encuentra el radical hidroxilo y el superóxido por su alta capacidad oxidante (Vaquero-Raya, E.C. *et al.* 2005).

El mecanismo principal de formación del radical $\cdot\text{OH}$ se observa en la Ilustración 2 y se conoce como reacción Fenton, la cual consiste en la reducción de H_2O_2 en presencia de un metal de transición. O bien, puede generarse mediante un mecanismo denominado reacción de Haber-Weiss y en este, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ reacciona con el H_2O_2 para generar los radicales $\cdot\text{OH}$ (Macedo, A. 2012).

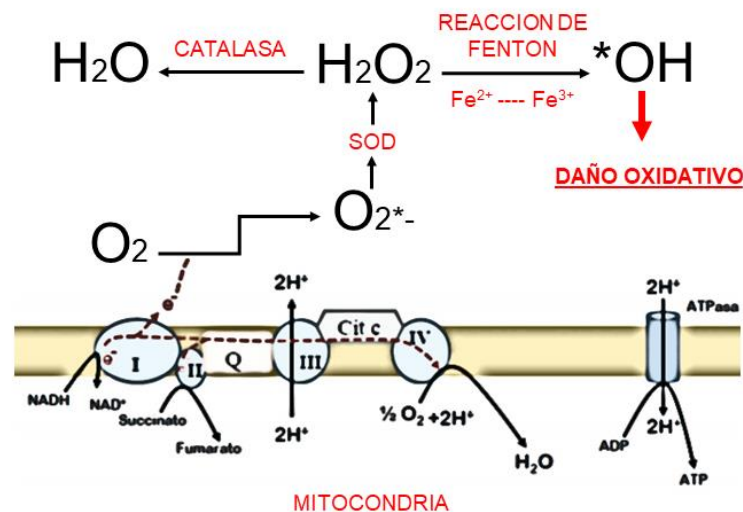


Ilustración 2.- Esquema de producción del radical hidroxilo durante la reducción de oxígeno molecular.

Las mitocondrias son la fuente principal de producción de las ROS entre las que se incluyen el radical $\cdot\text{OH}$. Durante la fosforilación oxidativa, existe un flujo de electrones (e^-) a través de los complejos de la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial interna, donde el oxígeno molecular es el último aceptor de electrones, dando como resultado la producción de agua y la obtención de energía con la formación de ATP. Durante su viaje a través de la cadena respiratoria, algunos electrones pueden escapar de los diversos complejos que forman la cadena y reducir el oxígeno molecular dando lugar a la formación del ion $\text{O}_2^{\cdot-}$, que mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), da origen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es inactivado por el sistema de defensa celular, sin embargo, en presencia de hierro o cobre se potencia la reacción de Fenton para formar el radical $\cdot\text{OH}$, responsable de la mayoría de los daños celulares causados por las ROS.

I.3. Terapia antioxidante

En condiciones de normoxia, la acumulación de ROS y otros radicales libres se neutraliza gracias a los mecanismos de defensa naturales, evitando así el estrés oxidativo. Sin embargo, estamos expuestos a factores como la contaminación atmosférica, comidas cocidas en exceso, el sedentarismo, el tabaquismo, los rayos UV y fármacos, que favorecen la generación de radicales libres creando una alteración del balance redox a favor de la sobreproducción de ROS que desencadenan una serie de reacciones químicas que pueden conducir a la aparición de graves desórdenes fisiológicos.

Entre los medios para combatir el estrés oxidativo cabe mencionar la nutrición clínica (antioxidantes naturales), la administración de antioxidantes sintéticos y de suplementos nutricionales. Los antioxidantes son moléculas capaces de impedir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la formación y propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Cardoso, C.L. *et al.* 2005). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan a las ROS al poseer una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar y estabilizar a un radical libre donándole un electrón o bien, un átomo de hidrógeno (Ilustración 3).

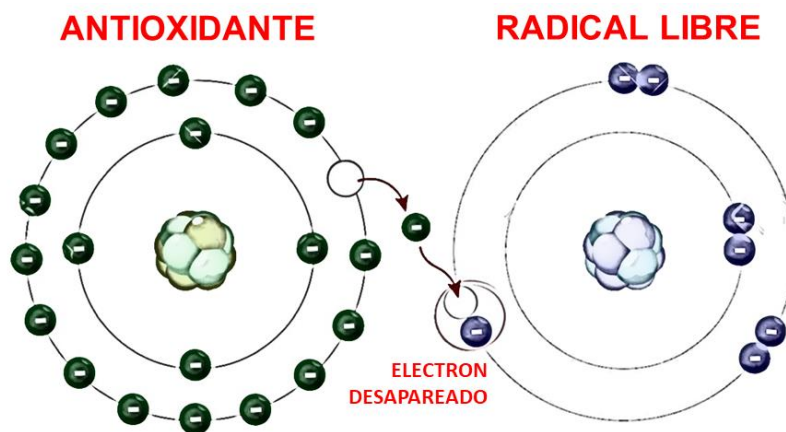


Ilustración 3.- Esquema del mecanismo de los antioxidantes para estabilizar a un radical libre.

Los antioxidantes pueden ser clasificados por su forma de actuar químicamente en dos grupos:

- Antioxidante primario: establecen una reacción directa con los radicales libres mediante la cual se genera como producto una especie menos reactiva previniendo de esta manera la oxidación.
- Antioxidantes secundarios: retrasan la oxidación a través de reacciones indirectas como quelación de metales, la reparación de antioxidantes primarios mediante la donación de átomos de H o electrones, descomposición de H_2O_2 en especies no radicalarias o absorción de luz UV.

Actualmente, la terapia más aceptada son los antioxidantes naturales provenientes de la dieta, especialmente frutas y vegetales. Ejemplo de estos son las vitaminas, los flavonoides, las catequinas, la quercetina, los licopenos, entre otros. Dentro de los antioxidantes es importante destacar a ciertos oligoelementos cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Estos oligoelementos son: cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro (Mayor-Oxilia, R. 2010).

I.4. Evaluación de la actividad antioxidante

Desde que se reconoce la implicación de los antioxidantes en la salud general del organismo, ha aumentado el interés por el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antioxidante. En este sentido, se han desarrollado experimentalmente diversos métodos analíticos *in vitro* que determinan de manera indirecta la actividad antioxidante de una molécula. Estos métodos cuantifican la actividad antioxidante mediante la valoración de la formación de productos intermediarios o finales que se dan por la reacción entre la especie oxidante, es decir, los radicales libres, y la especie antioxidante. Por lo tanto, es indispensable utilizar más de un método para evaluar este parámetro.

Estos métodos se destacan por ser rápidos, reproducibles y requerir mínimas cantidades de muestra y reactivo. Se pueden dividir en dos categorías (Tabla 1): por transferencia de electrones y por transferencia de átomos de hidrógeno (Huang, D. et al. 2005; Ndhlala, A. *et al.* 2010).

Tabla 1.- Clasificación de los métodos de ensayo in vitro para determinar la actividad antioxidante según su mecanismo de reacción.

Categoría	Ensayo
Ensayos basados en la transferencia de electrones	Ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).
	Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)
	N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD)
	Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC)
Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)
	Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)
	Inhibición de la oxidación del ácido linoleico
	Inhibición de la oxidación de lípidos de baja densidad (LDL)
	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

Los métodos basados en la transferencia de electrones ejercen una reacción redox que involucra dos componentes, la especie oxidante y la antioxidante. En esta reacción, seguida espectrofotométricamente, el oxidante es el indicador del punto final de la reacción. El cambio de color del oxidante se interpreta como la remoción del electrón del antioxidante lo cual indica un cambio proporcional a la concentración de antioxidantes en la reacción. Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH debido a que presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones. Por otra parte, en los ensayos basados en la transferencia de un átomo de hidrogeno se establece una reacción cinética competitiva misma que, por lo general, se compone de una molécula oxidable, un antioxidante y una especie que genera un radical libre.

Generalmente estos métodos son más relevantes en estudios donde se pretende evaluar la capacidad del antioxidante para romper la cadena de formación de radicales (Ndhlala, A. *et al.* 2010).

I.4.1. Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

La capacidad de la molécula radical DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno fue medida por primera vez por el investigador Marsden S. Blois en 1958 (Blois, M.S. 1958). Esta molécula es un radical libre que permanece estable debido a la deslocalización de un electrón que permanece desapareado sobre la molécula completa. Esta deslocalización es la razón del intenso color violeta de la molécula la cual, disuelta en metanol, muestra una longitud de onda de 517 nm. El fundamento del método (Ilustración 4), consiste en la reacción de la solución de DPPH con la especie antioxidante, la cual dona un átomo de hidrogeno que, de manera gradual, ocasionará el desvanecimiento del color violeta, mismo que se monitorea espectrofotométricamente.

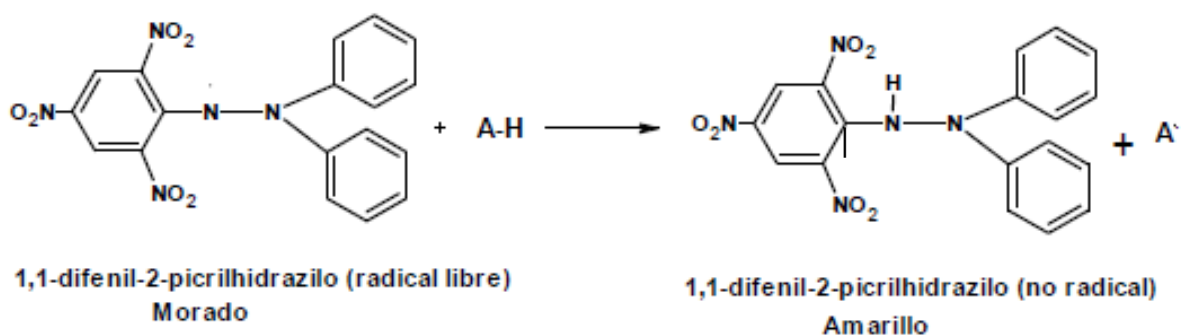


Ilustración 4.- Estructura de la especie radical DPPH antes y después de la reacción con la especie antioxidante (Alam, Md.N. et al. 2012).

Los resultados de esta técnica pueden expresarse de distintas formas, aunque la manera clásica de hacerlo es presentándolos como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria conocida también como IC₅₀. Este valor refleja la cantidad necesaria de antioxidante para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%, además de representar la potencia de una sustancia en la inhibición de una

función biológica o bioquímica. El valor IC₅₀ se calcula graficando el porcentaje de inhibición, es decir, la actividad antioxidante, contra la concentración de la muestra.

I.4.2. Ensayo ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

La primera vez que se llevó a cabo este ensayo fue enfocado en la activación de la metilmioglobina con H₂O₂ en presencia del ABTS para generar un radical catión. Este ensayo fue criticado debido a la contribución en la reducción del radical ferrilmioglobina dada por la reacción de los antioxidantes, por lo que se desarrolló un nuevo ensayo que consiste en una técnica de decoloración, donde se genera una molécula radical ABTS más estable antes de reaccionar con la especie antioxidante como se muestra en la Ilustración 5 (Re, R. *et al.* 1999).

En este nuevo ensayo, los valores son medidos espectrofotométricamente ya que el radical catión ABTS^{•+} genera una tonalidad verde-azul al reaccionar con persulfato de potasio K₂S₂O₈ que disminuye en intensidad a medida que se reduce por la especie antioxidante. Por esto, el grado de decoloración se puede expresar como el porcentaje de la actividad antioxidante, el cual se determina en función de la concentración y el tiempo.

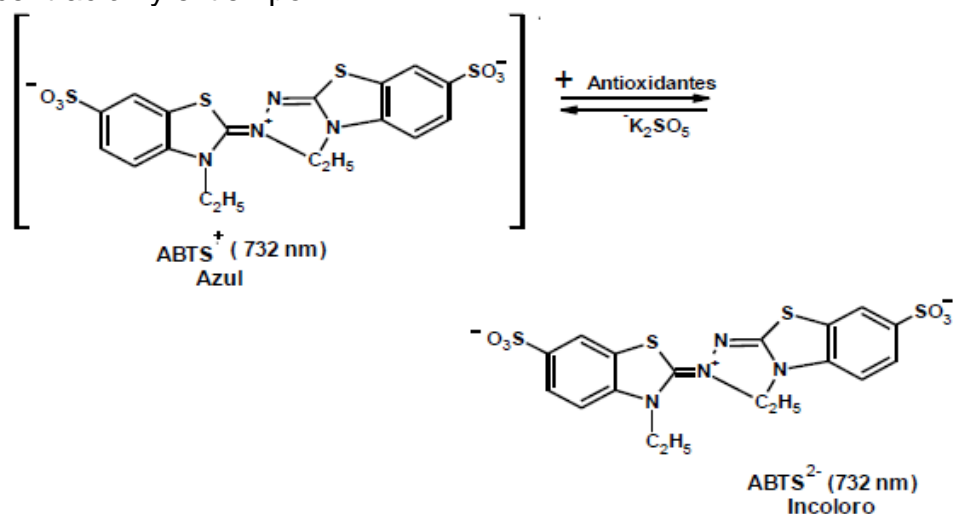


Ilustración 5.- Estructura de la molécula ABTS antes y después de reaccionar con la especie antioxidante (Zuleta, A. *et al.* 2009).

II. ANTECEDENTES

En el pasado, las aplicaciones farmacológicas de moléculas con metales se encontraban reducidas al campo de los trastornos y patologías mentales hasta que, en los años 60, Barnett Rosenberg (Rosenberg, B. *et al.* 1965) encontró la eficiencia biológica del *cis*-platino y sus análogos en la terapia anticancerígena. A raíz del éxito de estos compuestos, la química bioinorgánica se ha centrado en el desarrollo de nuevos metales-fármacos con capacidad terapéutica. Más recientemente, se ha encontrado que metales como el vanadio, el cobre, el molibdeno, la plata y el oro (Aguilar, O. *et al.* 2012) tienen capacidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y como sustitutos de la insulina, entre otros.

Es importante considerar que la mayoría de los fármacos comerciales están basados en la química del carbono y que el desarrollo de moléculas-fármacos que contienen iones metálicos avanza muy lentamente. En parte, porque ha prevalecido más el estudio de sus propiedades fisicoquímicas que el de sus efectos biológicos y, por otro lado, porque existe cierto rechazo a los compuestos que incorporan metales en sus estructuras por su toxicidad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que muchos metales son esenciales para el organismo, por lo que, se entiende que la toxicidad no se haya en el metal sino en la dosis.

II.1. Tiometalatos de amonio

Los sulfuros de metales de transición han sido ampliamente utilizados como catalizadores en la industria del petróleo en procesos que contribuyen en la remoción de contaminantes como el azufre o el nitrógeno (Weisser, O. & Landa, S. 1973, Topsoe, H. *et al.* 1996). Entre ellos, los sulfuros de molibdeno (MoS_2) y tungsteno (WS_2) son particularmente activos para la producción de combustibles con bajo contenido de azufre mediante un proceso denominado hidrodeshulfuración (HDS, por hydrodesulfurization). Estos catalizadores se pueden obtener por diferentes rutas de síntesis que incluyen el método cerámico (Al-Hilli, A.A. *et al.* 1972), el método de comaceración (Hagenbach, G., *et al.* 1973), la precipitación

homogénea de sulfuros (Candia, R. *et al.* 1981), y la descomposición de tiosales (Fuentes, S. *et al.* 1988), como sería el caso de la descomposición del tiometalatos (Mo/W) de amonio.

En el desarrollo de nuevos catalizadores se ha encontrado que el soporte catalítico no forma parte de la fase activa, por lo que, los catalizadores no soportados han sido motivo de interés a fin de determinar la influencia de la fase activa en distintos parámetros fisicoquímicos y cinéticos. En este sentido, el método de la descomposición de tiosales es uno de los más ampliamente usados para preparar sólidos sulfurados no soportados.

Por otro lado, en los años 80 se encontró evidencia de que cierta cantidad de carbono influye en las propiedades fisicoquímicas y en la actividad catalítica de sulfuros no soportados, los cuales son sintetizados a partir de la descomposición térmica de tiosales que contienen carbono (Pecoraro, T.A. & Chianelli, R.R. 1981). Más recientemente, Alonso, G. *et al.* (Alonso, G. *et al.* 1998, Alonso, G. *et al.* 2001) desarrollaron una nueva metodología para la síntesis de precursores denominados tiometalatos de tetraalquilmonio $(R_4N)_2MS_4$ (M=Mo/W; R=cadena alquílica), cuya descomposición *in situ* genera catalizadores en el sistema $MoS_{2-x}C_x$ o del tipo $WS_{2-x}C_x$. Los resultados sugieren que la cadena alquílica mejora el área específica y la selectividad de estos catalizadores (Alonso, G. *et al.* 2004).

II.2. Actividad biológica de los Tiometalatos (Mo/W) de amonio.

El tetratiomolibdato de amonio (TMA) ha sido ampliamente utilizado en la clínica en el tratamiento de la enfermedad de Wilson, la cual consiste en la acumulación de cobre en el cerebro, hígado, entre otros órganos (Brewer, G.J. *et al.* 1991, Brewer, G.J. 2003). Aunque el cobre tiene un papel fundamental en el organismo para mantener el desarrollo de nervios, huesos, colágeno o melanina, la acumulación de este oligoelemento podría ser un riesgo potencial para la vida (Danks, D.M. 1988).

Según las investigaciones, el TMA es un excelente quelador del cobre (Ilustración 6) cuyo mecanismo consiste en reducir al cobre presente en la sangre y formar

complejos con él, generando una especie no tóxica (George, G.N. *et al.* 2003). Debido a esto, el TMA ha sido probado en la terapia anti-cobre para la enfermedad de Wilson, encontrando que es efectivo para disminuir la biodisponibilidad de cobre en el organismo y que, además tiene baja toxicidad y presenta menos efectos secundarios en comparación con las terapias tradicionales (Brewer, G.J. *et al.* 2006). En los últimos 35 años, el TMA se ha utilizado como un fármaco experimental estrechamente monitorizado, y actualmente se encuentra en ensayos clínicos multinacionales de fase 2 y fase 3 (Aggarwal, A. *et al.* 2018).

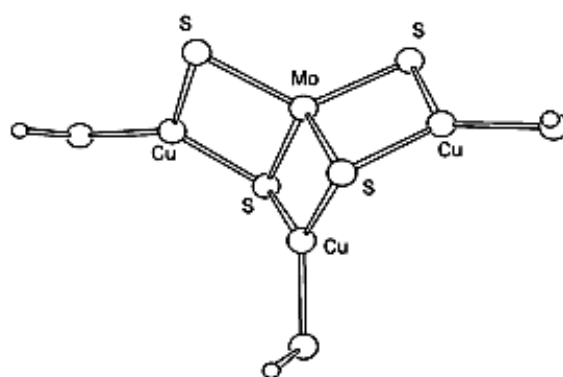


Ilustración 6.- El TMA tiende a formar especies con el cobre por dos de sus ligandos de azufre (Ilustración tomada de George, G.N. *et al.* 2003).

Los estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* más recientes indican que el TMA tiene propiedades antiangiogénicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas y antifibróticas (Brewer, G.J. 2000). Por sus excelentes propiedades terapéuticas, los investigadores se han centrado en estudiar esta tiosal de molibdeno en el tratamiento contra el cáncer, encontrando que el TMA es efectivo en la terapia antitumoral (Redman, B.G. *et al.* 2003, Kim, K.K. *et al.* 2012, Sahota, S. *et al.* 2017).

Con respecto a la actividad biológica del tiosal de amonio (TTA), se encuentran pocos estudios que evalúen su capacidad terapéutica. El equipo de investigación del Dr. G.J. Brewer utilizaron modelos *in vivo* de ratones obteniendo resultados que sugieren que el TTA es efectivo para la quelación del cobre (anticobre), terapia antitumoral (antiangiogénico) y protección contra el daño

cardiaco (antiinflamatorio). Los autores encontraron que el TTA es igual de efectivo en comparación con el TMA, pero requiere una dosis mayor, lo cual puede sugerir mayor inestabilidad en sistemas biológicos (Hou, G. *et al.* 2007).

II.3. Hipótesis

Debido a la analogía que existe entre el molibdeno y el tungsteno se sugiere que el TTA tendrá propiedades terapéuticas similares a las que exhibe el TMA. En este sentido, se propone la síntesis de diferentes tiorungstatos modificados con una cadena alquílica como materiales con actividad biológica.

II.4. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar la actividad antioxidante del TTA y los TTA modificados con una cadena alquílica mediante los ensayos *in vitro* DPPH y ABTS para evaluar la influencia de la cadena alquílica en aspectos de la actividad biológica.

II.4.1. Objetivos específicos

- Sintetizar el TTA como material de referencia
- Sintetizar los TTA modificados con una cadena alquílica de diferente longitud:



- Caracterizar los materiales.
- Determinar la actividad antioxidante de los materiales mediante las técnicas *in vitro* DPPH y ABTS.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Reactivos

En la Tabla 2 se enlista los reactivos empleados durante la síntesis del precursor TTA ((NH₄)₂WS₄) y de las tiosales que han sido objeto de estudio en este trabajo de tesis.

Tabla 2.- Descripción de los reactivos utilizados para la síntesis de los materiales de estudio.

Compuesto	Fórmula molecular	Peso Molecular (g/mol)	Pureza
Metatungstato de amonio hidratado	(NH ₄) ₆ H ₂ W ₁₂ O ₄₀ xH ₂ O	2956.3	99%
Hidróxido de Amonio	NH ₄ OH	35.05	28-30%
Sulfuro de hidrógeno	H ₂ S	34.08	≥99%
Cloruro de cetil trimetil amonio	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(Cl)(CH ₃) ₃	319.5	99%
Bromuro de dodecil trimetil amonio	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(Br)(CH ₃) ₃	308	99%
Bromuro de Octil trimetil amonio	CH ₃ (CH ₂) ₇ N(Br)(CH ₃) ₃	252	99%

III.2. Síntesis del precursor tiotungstato de amonio (TTA)

El TTA se obtuvo en el laboratorio siguiendo el método reportado por (Ramanathan, K. & Weller, S.W. 1985; Alonso, G. *et al.* 2004). La síntesis se realizó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL donde se disolvió 15 g de metatungstato de amonio hidratado ((NH₄)₆H₂W₁₂O₄₀xH₂O) en 75 mL de agua destilada y 52.5 mL de hidróxido de amonio (NH₄OH). La mezcla resultante se sometió a burbujeo con H₂S durante 6 horas a una temperatura de 60 °C (333 K) y con agitación constante (Ilustración 7.A).

Al finalizar la reacción, la solución se dejó reposar en baño de hielo durante 12 horas con el objetivo de favorecer la cristalización del producto (Ilustración 7.B). Por

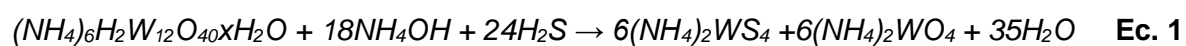
último, el producto fue filtrado a vacío intercalando lavados de agua destilada y alcohol isopropílico por triplicado.

Se obtuvieron cristales color naranja (Ilustración 7.C) que se secaron en la estufa a 30 °C durante 2 horas para eliminar humedad y finalmente fueron guardados en atmosfera de N₂ para prevenir la oxidación del material.



Ilustración 7.- (A) Sistema base para la síntesis del TTA. (B) Baño de hielo para inducir la cristalización. (C) Cristales característicos del TTA.

La siguiente ecuación corresponde a la reacción generada en la síntesis:



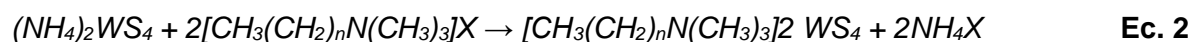
III.3. Síntesis de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio

A continuación, se describe el método de preparación de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio. La síntesis se lleva a cabo en medio acuoso y corresponde a la descrita por Alonso, G. *et al.* (Alonso, G. *et al.* 2001), donde el TTA reacciona con las sales de amonio en una sustitución rápida de un paso que involucra un intercambio de los iones (NH_4^+) del TTA con la cadena alquílica ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{CH}_3)_3$) entregada por las sales de amonio. Se sintetizaron tres TTA modificados con una cadena alquílica de diferente longitud. La nomenclatura utilizada se observa en el Tabla 3.

Tabla 3.- TTA modificados con una cadena alquílica.

Nombre	Nomenclatura	Formula Molecular	Peso Molecular (g/mol)
Tiotungstato de Octiltrimetilamonio	TOctilTTA	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{WS}_4$	656
Tiotungstato de Dodeciltrimetilamonio	TDodecilTTA	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{WS}_4$	768
Tiotungstato de Hexadeciltrimetilamonio	THexadecilTTA	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{WS}_4$	880

A continuación se presenta la ecuación que describe la reacción entre el TTA y la sal de amonio:



Dónde: $n \rightarrow 7, 11, 15.$

$X \rightarrow \text{Br o Cl.}$

III.3.1. Síntesis del tiotungstato de octiltrimetilamonio (TOctilTTA)

Se disolvieron 2 g (5.74 mmol) del precursor TTA en 25 mL de agua destilada en agitación constante; se añadió el doble de cantidad molar de la sal bromuro de octiltrimetilamonio, previamente disuelta en 25 mL de agua destilada. La mezcla se sometió a 3 horas de agitación y posteriormente a 12 horas de reposo a temperatura ambiente para favorecer el proceso de cristalización (Tabla 4).

III.3.2. Síntesis de los tiotungstos de dodeciltrimetilamonio (TDodecilTTA) y hexadeciltrimetilamonio (THexadecilTTA)

En la síntesis de los tiometalatos restantes, se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente manteniendo la misma relación milimolar de las sales de amonio con respecto al TTA. Sin embargo, el procedimiento tiene algunas variaciones que se indican a continuación. La sal bromuro de dodeciltrimetilamonio se disuelve ahora en 35 mL para sintetizar TDodecilTTA, y para la síntesis de THexadecilTTA, se omite el paso de la disolución previa debido a que el cloruro de hexadeciltrimetilamonio se encuentra en estado líquido. En la Tabla 4 se enlistan los reactivos y las cantidades empleadas para las síntesis anteriores.

Tabla 4.- Reactivos y cantidades utilizadas para las síntesis de los tiotungstos de alquiltrimetilamonio.

Muestra	Masa TTA (g)	Vol. H ₂ O ₂ (mL)	Sal de amonio	Masa (g)	mmoles	Vol. H ₂ O ₂ (mL)
TOctilTTA	2	25	Bromuro de octiltrimetilamonio	2.8929	11.48	25
TDodecilTTA	2	25	Bromuro de dodeciltrimetilamonio	3.5358	11.48	35
THexadecilTTA	2	25	Cloruro de hexadeciltrimetilamonio	3.6678	11.48	0

III.4. Recuperación de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio sintetizados

La solución con el precipitado se dividió en volúmenes equivalentes en tubos de ensayo de vidrio y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. Finalizada la sedimentación, se extrajo la fase líquida con ayuda de una pipeta Pasteur y el precipitado contenido en los tubos de ensayo fue secado en un horno a 30 °C, ya que por encima de esta temperatura el material sufre efectos de descomposición. La emulsión generada se dispersó en una superficie plana y fue secada con pistola de aire para su posterior almacenamiento en atmósfera inerte. (Ilustración 8). Finalmente, los materiales se almacenaron a 15 °C en el refrigerador para favorecer su conservación.

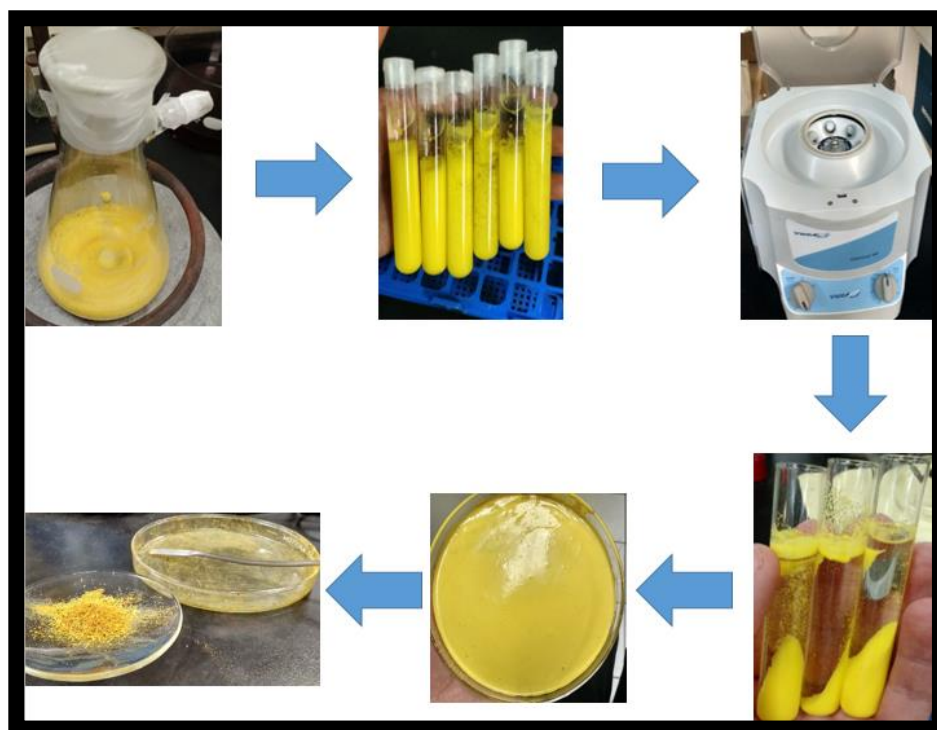


Ilustración 8.- Esquema sobre el proceso de recuperación de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio.

III.5. Caracterización

A continuación, se describen las técnicas utilizadas para caracterizar los materiales sintetizados durante este proyecto de tesis. También se indica el pre-tratamiento de la muestra a caracterizar.

III.5.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Las tiosales sintetizadas se analizaron con un espectrómetro de infrarrojo Perkin-Elmer con modo de transmisión de transformada de Fourier (FTIR). El método de obtención del espectro infrarrojo implica un pretratamiento a la muestra donde se mezcla aproximadamente 1 mg de la muestra a analizar con 100 mg de bromuro de potasio (KBr) grado espectro anhidro. Posteriormente se trituroó en un mortero, y con ayuda de una matriz (Ilustración 9.A), se comprimió en una prensa hidráulica a una presión de 3000 psi hasta formar una pastilla traslúcida y uniforme (Ilustración 9.B).

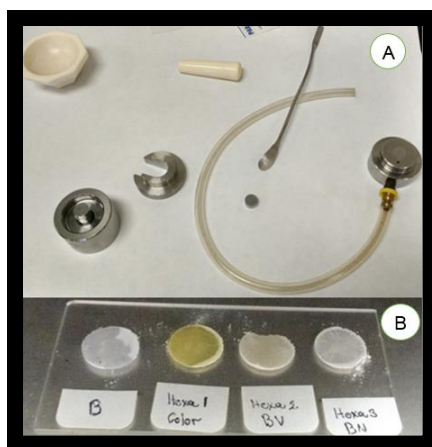


Ilustración 9.- (A) Equipo para pretratamiento a la muestra para análisis FTIR. (B) Pastilla traslúcida lista para medición.

Una vez obtenida la pastilla se dejó secar en el horno por un mínimo de 6 horas a 35 °C y posteriormente la pastilla se colocó en el porta muestras del espectrómetro y se analizó a 100 ciclos con intervalos espectrales de 4000 a 370 cm^{-1} .

III.5.2. Espectroscopía UV-vis

El TTA y los TTA de alquiltrimetilamonio se analizaron en un espectrofotómetro Hach DR600 (Ilustración 10). Se prepararon muestras de cada especie disuelta en metanol a fin de obtener una concentración 0.1 M. Las muestras se analizaron utilizando una cubeta de vidrio en un intervalo de onda de 200 a 500 nm.



Ilustración 10.- Espectrómetro DR600.

III.6. Determinación de la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de los biomateriales sintetizados se determinó mediante dos ensayos *in vitro* que incluye el radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y el radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). Considerando que ambas moléculas son sensibles a la luz, toda la manipulación, pesaje, transporte, ensayo, etc. se realizó en ausencia de luz para conservar la estabilidad de los radicales. Ambos ensayos monitorean la reducción del radical en cuestión mediante espectroscopia de UV-Vis a una longitud de onda característica, según se describe a continuación:

III.6.1. Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

Este ensayo fue propuesto y desarrollado por Marsden S. Blois en 1958 (Blois, M.S. 1958). La técnica consiste en hacer reaccionar el radical libre DPPH con el biomaterial que presenta la característica antioxidante. A medida que el electrón disponible del DPPH se aparea, el color violeta característico del radical desaparece de manera simultánea junto con la absorción (Ilustración 11), determinada a una longitud de onda de 517 nm en un medio de metanol.

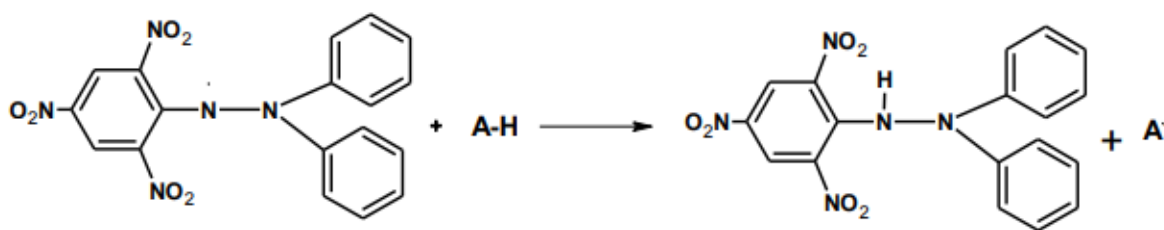


Ilustración 11.- Mecanismo de reacción de la molécula DPPH al reaccionar con el compuesto antioxidante.

- **Preparación de la molécula DPPH**

Se pesó aproximadamente 1.5 mg de la molécula DPPH, se disolvió en metanol y se llevó a aforo en matraz volumétrico de 50 mL. La solución presentó una coloración violeta intenso, la cual, finalmente se analizó por espectrofotometría UV-Vis a 517 nm obteniendo una absorbancia de 1 ± 0.1 .

- **Preparación de las muestras**

Los materiales se evalúan en solución usando metanol como disolvente a distintas concentraciones. Las tiosales se evaluaron a las pocas horas de sintetizarlas (frescas) a fin de evitar la influencia de la degradación del material en el estudio de DPPH.

Se preparó una solución patrón 0.05 mg/mL debido a las diferencias presentadas en la actividad antioxidante, en la Tabla 5 se muestran los intervalos de concentración donde se encontró un perfil lineal durante la reacción entre la tiosal y el DPPH.

Tabla 5.- Concentraciones donde se encontró un perfil lineal en la reacción con el DPPH.

Sln. TTA (mg/mL)	Sln. TOctilTTA (mg/mL)	Sln. TDodecilTTA (mg/mL)	Sln. THexadecilTTA (mg/mL)
0.00125	0.00063	0.00125	0.0025
0.0025	0.00125	0.0025	0.005
0.005	0.0025	0.005	0.01
0.01	0.005	0.007	0.015
0.02	0.01	0.009	0.02
0.03	0.02	-	0.025
0.04	0.03	-	-
0.05	-	-	-

- **Ensayo de Actividad Antioxidante**

El ensayo se realizó tres veces tomando muestras por triplicado para cada concentración mencionada anteriormente en la Tabla 5. Todas las series estuvieron constituidas por 1 mL de muestra y 1 mL de la solución preparada de DPPH en tubos de ensayo de plástico; como blanco se sustituyó la cantidad de muestra por 1 mL de metanol. Los tubos se mantuvieron tapados y a temperatura ambiente para evitar la evaporación de la solución, procurando completa oscuridad durante 30 min.

Por último, se analizó la absorbancia por espectrofotometría UV-visible de cada muestra partiendo de la más diluida a la más concentrada.

Al aumentar la concentración de la muestra se presenta una disminución de la absorbancia que implica un cambio de coloración de la solución de violeta a amarillo el cual puede interpretarse como la reducción del radical libre.

III.6.2. Ensayo ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Este ensayo fue desarrollado por Re, R. et al. 1999 (Re, R. *et al.* 1999) y desde entonces ha sido ampliamente utilizado por su sencillez y practicidad para evaluar actividad antioxidante. El método tiene como fundamento hacer reaccionar la molécula ABTS con un agente oxidante como el persulfato de potasio a fin de formar el radical libre ABTS^{•+} el cual hace reacción con el biomaterial que presenta la característica antioxidante a una longitud de onda de 754 nm en un medio de metanol (ilustración 12). A medida que el electrón disponible del ABTS^{•+} se aparea, el color verde-azulado característico del radical desaparece de manera simultánea junto con la absorción.

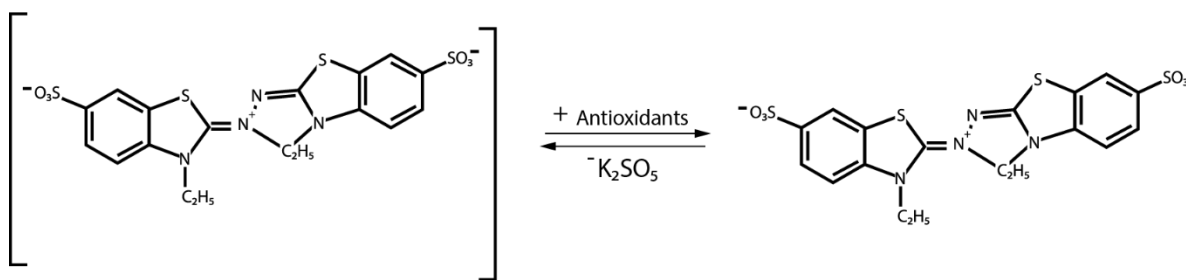


Ilustración 12.- Mecanismo de reacción de la molécula ABTS al reaccionar con el compuesto antioxidante.

- **Preparación de la molécula ABTS**

Para la formación inicial del radical de la molécula ABTS se pesaron aproximadamente 19.4 mg de ABTS, a los que se agregaron 3.3 mg de persulfato de potasio como agente oxidante. Una vez mezclados, se disolvieron en 5 mL de agua destilada generando al instante una solución verde-azulada.

La reacción de oxidación del persulfato de potasio se llevó a cabo en ausencia de luz y a temperatura ambiente por 16 horas. Transcurrido este tiempo, la solución se considera viable durante un periodo máximo de 48 horas.

- **Preparación de las muestras**

Debido a las diferencias presentadas en la actividad antioxidante, se prepararon soluciones a diversas concentraciones de las distintas tiosales a partir de una solución patrón de concentración 0.5 mg/mL. La Tabla 6 presenta los intervalos de concentración donde se encontró un perfil lineal durante la reacción de la tiosal y el ABTS. Se utilizó agua destilada como disolvente para el TTA y una mezcla en partes iguales de agua destilada y metanol para el TOctilTTA y totalmente metanol para los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio restantes.

Tabla 6.- Concentraciones donde se encontró un perfil lineal en la reacción con el ABTS.

Sln. TTA mg/mL	Sln. TOctilTTA mg/mL	Sln. TDodecilTTA mg/mL	Sln. THexadecilTTA mg/mL
0.001	0.008	0.01	0.01
0.005	0.01	0.05	0.05
0.01	0.05	0.1	0.1
0.02	0.1	0.2	0.2
0.05	0.15	0.3	0.3
0.08	0.2	-	0.4
0.1	-	-	-

- **Ensayo de Actividad Antioxidante**

Se diluyeron 150 μ L de solución inicial de ABTS en 15 mL de metanol y posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla por espectroscopía UV-visible a 754 nm y se obtuvo una absorbancia de 0.7 ± 0.1 .

Considerando como blanco la solución pura de ABTS, se realizó tres veces el ensayo tomando muestras por triplicado para cada concentración mencionada anteriormente en la tabla 6. Cada medición estuvo compuesta por 20 μ L de muestra y 980 μ L de la solución preparada de ABTS en viales de vidrio para cromatografía.

Una vez agregados los 980 μ L, los viales se taparon y conservaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 7 min. Por último, se analizó la absorbancia por

espectrofotometría UV-visible de cada muestra partiendo de la más diluida a la más concentrada.

Se encontraron variaciones mínimas con respecto al blanco en la absorbancia de las muestras más diluidas. Al aumentar la concentración de la muestra se presenta un aumento en dicha variación de absorbancia que puede traducirse como la reducción del radical ABTS^{•+} la cual implica una pérdida de coloración en la solución.

III.6.3. Expresión de los resultados para la actividad antioxidante

III.6.3.1. Ensayo DPPH

$$\%Act. Antiox = \left[1 - \left(\frac{A1}{A2} \right) \right] \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

A1= Absorbancia de la muestra

A2= Absorbancia del blanco de muestra

III.6.3.2 Ensayo ABTS

$$\%Act. Antiox = \left[\left(\frac{A2-A1}{A2} \right) \right] \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

A1= Absorbancia de la muestra

A2= Absorbancia del blanco de muestra

III.6.3.3. Expresión de la IC₅₀

La IC₅₀ expresa la concentración media de tiosal en que se obtiene un 50% de inhibición del radical libre DPPH o ABTS. Esta concentración se calcula a partir de la ecuación de la recta obtenida al graficar % Act. Antiox. vs concentración de la muestra.

III.7. Análisis Estadístico

Los resultados de la actividad antioxidante se evaluaron mediante un análisis estadístico para encontrar las diferencias significativas entre las medias de tres ensayos independientes. Las pruebas se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistic con un intervalo de confianza del 99%. Para las pruebas de normalidad se consideró la prueba Shapiro-Wilk por tener un número de muestras menores a 30, mientras que la comparación de las medias se realizó mediante la prueba t-Student para dos muestras independientes.

III.7.1. Prueba t-Student

La prueba t-student se basa en las distribuciones t las cuales son una familia de distribución simétrica de los datos conocida como distribución normal. La manera en que se genera esta distribución cambia conforme el diseño de la muestra. Se utiliza para comparar diferencias entre promedios o medias de dos grupos independientes o, en su defecto, comparar promedios de dos observaciones realizadas a un mismo sujeto.

Esta prueba contrasta hipótesis sobre valores de diferentes medias:

H_0 = La hipótesis nula representa que las medias de dos muestras son iguales.

H_1 = La hipótesis alternativa representa que las medias de las muestras son significativamente distintas.

- **Prueba t-Student para dos muestras independientes**

La prueba se realizó para contrastar la hipótesis nula de no existencia de diferencias significativas entre las medias de dos variables que tienen como comportamiento una distribución normal y número de medidas en los mismos sujetos, o bien, la hipótesis alternativa de no existencia de diferencias significativas entre la media de una misma variable medida en situaciones diferentes en los mismos sujetos. Cuando la probabilidad (p -valor) fue mayor que α (> 0.05), se acepta la hipótesis nula, en caso contrario se acepta la hipótesis alternativa de diferencias significativas entre las medias de ambas variables, al nivel de significación α .

La significancia estadística es expresada en este trabajo mediante asteriscos donde un asterisco (*) expresa $P < 0.05$, doble asterisco (**) para $P < 0.01$ y triple asterisco (***) para $P < 0.001$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sintetizaron los materiales utilizando el método que se describe en el apartado III.2 y III.3 y se determinó el rendimiento de la reacción, el cual se muestra en la Tabla 7. Se obtuvieron partículas finas de color amarillo intenso como se observa en la Ilustración 8.

Durante el trabajo de tesis se observó que la incorporación de la cadena alquílica cambia la solubilidad de los tiotungstos, mientras el TTA es soluble en agua, los TTA modificados con carbono son insolubles en agua y solubles en metanol. También se encontró que los TTA con cadena alquílica son inestables frente al calor y a la humedad, y que, bajo estas condiciones los materiales se degradan rápidamente cambiando de color y formando agregados húmedos. Este efecto se ve más acentuado en función de la longitud de la cadena alquílica, siendo el THexadecilTTA el material más inestable y menos soluble.

Tabla 7.- Rendimiento de las reacciones.

Compuesto	Estructura	Peso molecular (g/mol)	Rendimiento (%)	Masa obtenida (g)
TTA	$(\text{NH}_4)_2\text{WS}_4$	348	86.26	9.0068
TOctilTTA	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{WS}_4$	656	71.77	1.3560
TDodecilTTA	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{WS}_4$	768	68.29	1.5073
THexadecilTTA	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{WS}_4$	880	78.26	1.9765

IV.1. Caracterización del TTA y los TTA modificados sintetizados

IV.1.1. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de transmisión FT-IR de los materiales estudiados se muestran en la Ilustración 13, donde se puede observar que todos los materiales sintetizados presentan un pico muy intenso de absorción a un número de onda aproximado a 460 cm^{-1} , atribuido a la vibración del estiramiento del enlace W-S (Alonso, G. *et al.* 1998). Además, en el espectro correspondiente al TTA se encontraron picos de

absorción a 1395 y 3128 cm^{-1} correspondientes a las señales de estiramiento N-H del grupo NH_4^+ .

Para el caso de los TTA de alquiltrimetilamonio encontramos nuevas bandas de absorción asociadas a la incorporación de la cadena alquílica y algunos cambios con respecto al control TTA. En primer lugar, se observa una disminución del pico de absorción a 1395 cm^{-1} y un pequeño desplazamiento a 1402 cm^{-1} , eventos que sugieren la formación del complejo trimetilamonio-TTA, ya que, la absorción a 1402 cm^{-1} está asociada a la vibración de estiramiento del enlace entre N- CH_3 .

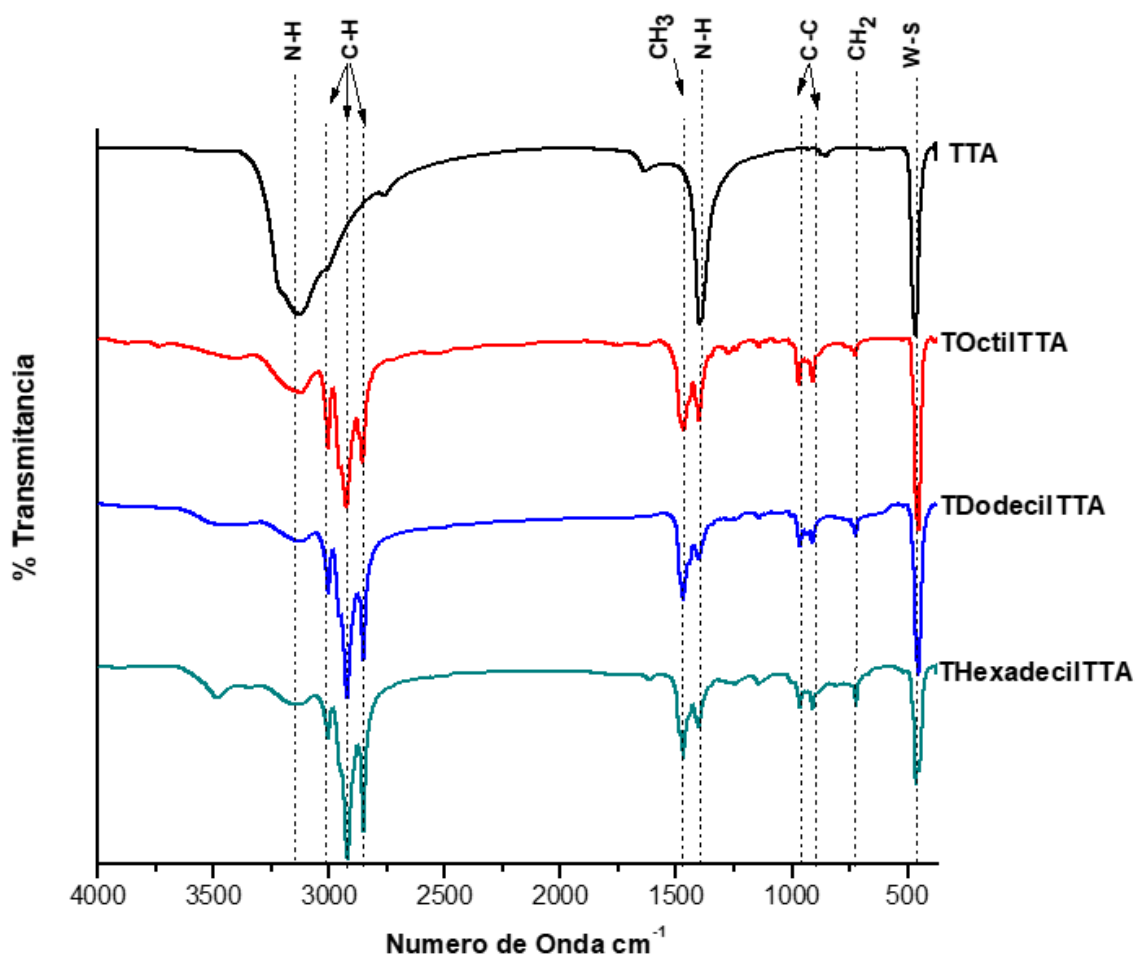


Ilustración 13.- Espectro FTIR para los TTA sintetizados.

El resto de las señales encontradas en los TTA de alquiltrimetilamonio se atribuyeron a enlaces C-H y C-C provenientes de la cadena alquílica (Tabla 8). Las bandas encontradas en 2925 y 2852 cm^{-1} se asignaron a la vibración de estiramiento

del enlace C-H en el metileno (-CH₂-), mientras que la señal de estiramiento -CH₂-CH₂- se observa a 722 cm⁻¹. También, se encuentra un pico a 3005 y 1468 cm⁻¹ relacionado con el plano antisimétrico vibracional en el metilo (CH₃) y con el estiramiento C-H del metilo (CH₃-), respectivamente. Por último, las bandas registradas en el rango de 970-905 cm⁻¹ fueron asignadas a las vibraciones de estiramiento C-C de la cadena alquílica (Van Senden, K.G. 1965).

Cada material sintetizado mostró las señales características para el estiramiento de los enlaces W-S, N-H, C-H y N-CH₃, las cuales sugieren la formación de los tiotungstos correspondientes (Tabla 8).

Tabla 8.- Señales de absorción obtenidas en el ensayo FTIR para los TTA.

TTA		TOctilTTA		TDodecilTTA		THexadecilTTA	
IR ν (cm ⁻¹)	Señal	IR ν (cm ⁻¹)	Señal	IR ν (cm ⁻¹)	Señal	IR ν (cm ⁻¹)	Señal
463	W-S	452	W-S	453	W-S	463	W-S
860	W-O	725	(CH ₂) _n con n≥4	722	(CH ₂) _n con n≥4	722	(CH ₂) _n con n≥4
1395	N-H	908	C-C	911	C-C	911	C-C
3128	NH ₄ ⁺ , N-H	970	C-C	965	C-C	966	C-C
		1402	N-CH ₃	1402	N-CH ₃	1402	N-CH ₃
		1468	CH ₃	1468	CH ₃	1468	CH ₃
		2855	C-H	2852	C-H	2852	C-H
		2925	C-H	2921	C-H	2920	C-H
		3005	C-H	3005	C-H	3005	C-H
		3128	N-H	3125	N-H	3125	N-H

El análisis de las señales de los TTA de alquiltrimetilamonio con relación a la proporción del compuesto (Tabla 9) referida a carbono/tungsteno presentó una tendencia que describe un aumento de intensidad en la señal conforme se añade una cadena alquílica más extensa.

Tabla 9.- Intensidad de las señales comparadas en relación a la proporción carbono-tungsteno.

Relación	TOctilTTA	TDodecilTTA	THexadecilTTA
C/W	0.907	1.23	1.81

IV.1.2. Espectrometría UV-Vis

Los espectros de absorbancia obtenidos de los materiales sintetizados se muestran en la Ilustración 14, donde se observa que la cadena alquílica no influye en las señales de absorción con respecto al espectro del precursor TTA.

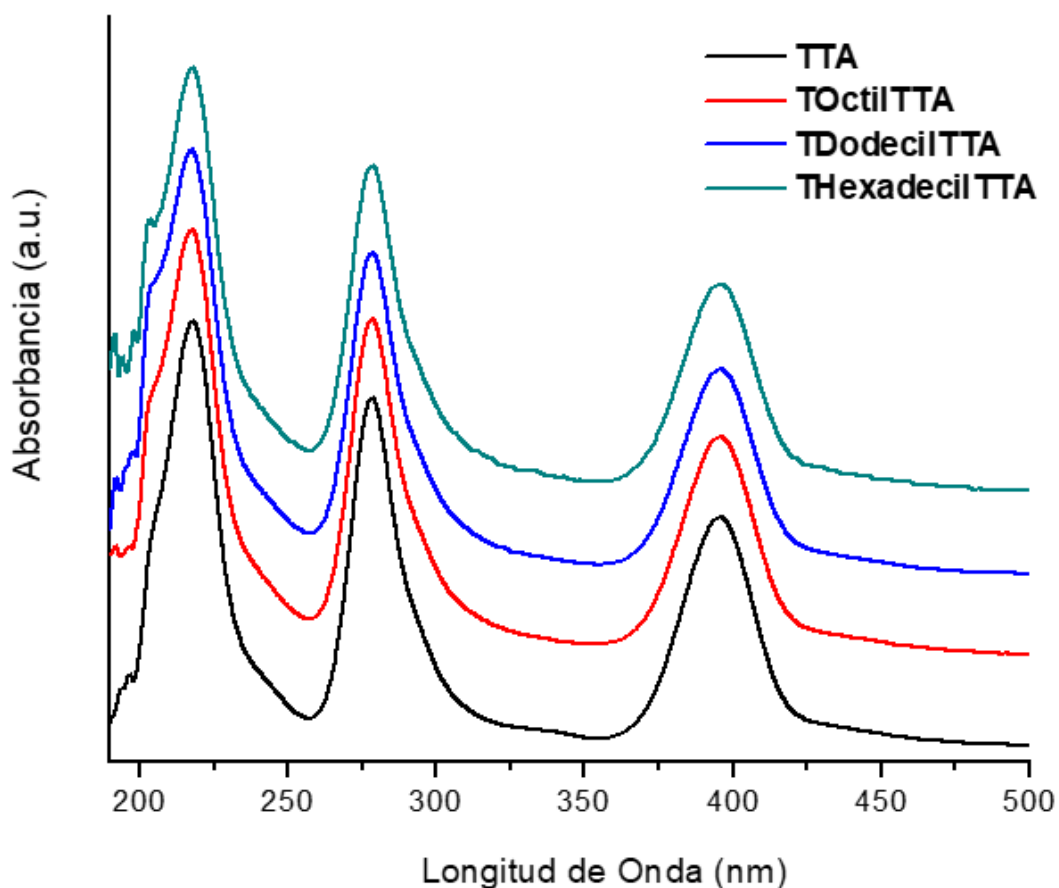


Ilustración 14.- Espectro de absorbancia UV-Vis obtenido de los TTA.

Las bandas de absorción obtenidas del grupo tetraédrico $(WS_4)^{-2}$ se muestran a una longitud de onda de 393, 276 y 216 nm las cuales concuerdan en compuestos similares según lo descrito por el grupo de investigación de G. Alonso (Alonso, G. *et al.* 2001).

IV.3. Determinación de la Actividad Antioxidante

IV.3.1. Técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinación de la actividad antioxidante

Los resultados de la técnica DPPH se muestran en la Ilustración 15. Es posible apreciar que los diferentes materiales ayudan en la captación de radicales libres, es decir, poseen propiedades antioxidantes que están directamente relacionadas con la dosis utilizada.

Además, se observó un aumento en la capacidad de captación de radicales libres en los TTA de alquiltrimetilamonio en comparación con el material precursor TTA. Estos resultados sugieren que la adición de la cadena alquílica mejora la actividad antioxidante para el ensayo *in vitro* del DPPH.

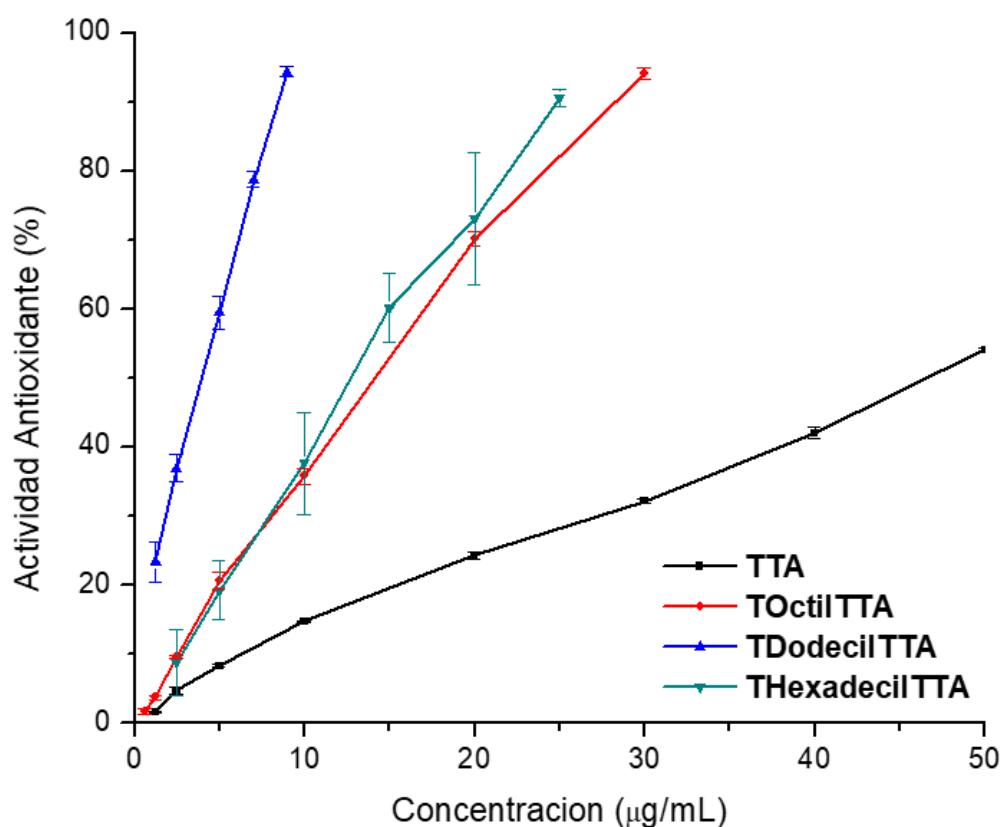


Ilustración 15.- Perfil de los TTA en el ensayo de DPPH. Curva de concentración vs actividad antioxidante.

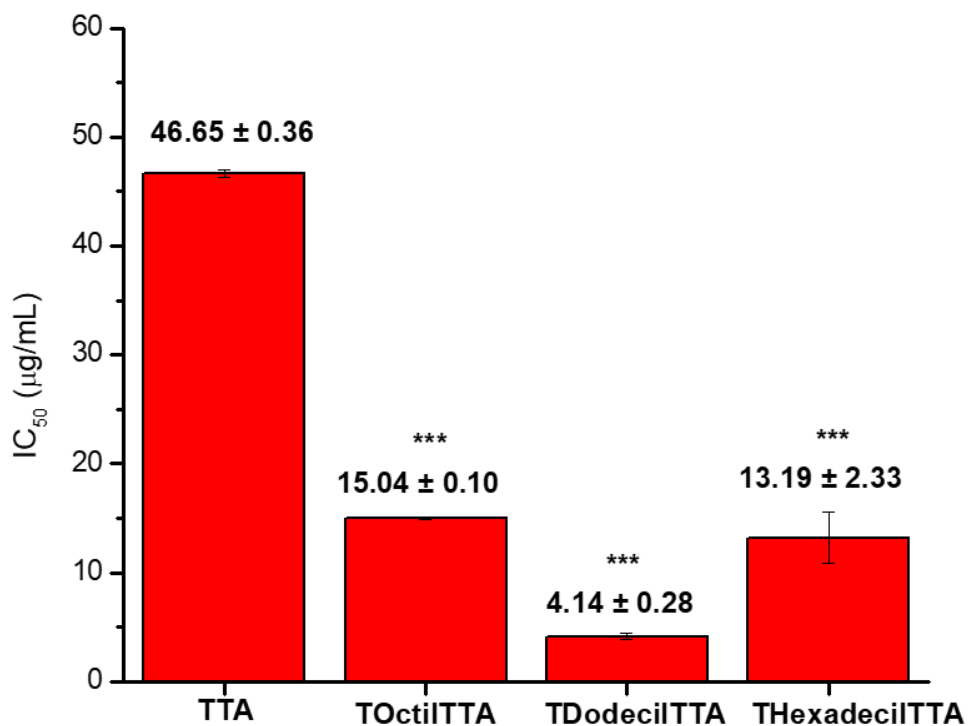
Los resultados obtenidos en la regresión lineal de los diferentes ensayos de la técnica DPPH se muestran en la Tabla 10, en la que se expresa la actividad de captación de radicales de los distintos materiales en términos de IC₅₀ (µg/mL). Estos resultados representan la media del experimento ± la desviación estándar (SD, por *standard deviation*) de tres experimentos independientes. Asimismo, en la Ilustración 16 se muestran los resultados de IC₅₀ y del análisis estadístico.

Tabla 10.- Datos obtenidos de la curva de calibración de los materiales antioxidantes analizados por el método in vitro DPPH.

Materiales	Ecuación de regresión (y = mx + b)	R ²	IC ₅₀ (µg/mL) ± SD
TTA	1.0184x + 2.4929	0.9943	46.65 ± 0.36
TOctilTTA	3.1941x + 1.9676	0.9931	15.04 ± 0.10
TDodecilTTA	9.2024x + 12.9520	0.9988	4.14 ± 0.28
THexadecilTTA	3.6404x + 1.2005	0.9951	13.19 ± 2.33

Se resalta que los tres TTA modificados con cadena alquílica muestran mejor actividad antioxidante (**p<0.001) en el ensayo de DPPH en comparación con el TTA, siendo el TDodecilTTA el material con un perfil más activo para inhibir el radical DPPH, con una IC₅₀ de 4.14 µg/mL (5.39 µM).

Por otro lado, en la Ilustración 16 se puede observar una promoción en la actividad antioxidante del TTA que aumenta en función de la cadena alquílica, como es el caso del TOctilTTA y el TDodecilTTA. Sin embargo, en el caso del THexadecilTTA se observa un perfil diferente, ya que se encontró una disminución en la actividad antioxidante. Esto podría sugerir que un exceso de carbono tapa los sitios activos del TTA, misma que se ve reflejada en la capacidad antioxidante del material.



*Ilustración 16.- Valores de IC₅₀ (µg/mL) de los materiales estudiados mediante la técnica DPPH. Se indica la significancia estadística de los TTA de alquiltrimetilamonio con respecto al material de referencia TTA (***)*p*<0.001).*

Los resultados de IC₅₀ obtenidos para el TTA, TOctilTTA, TDodecilTTA y THexadecilTTA fueron 46.65, 15.04, 4.14 y 13.19 µg/mL (134, 22.9, 5.39, 14.8 µM), respectivamente. En este sentido, el ácido ascórbico conocido comúnmente como vitamina C es un excelente antioxidante natural que generalmente se utiliza como referencia, el cual presenta valores de IC₅₀ entre 10-600 µM por el método DPPH (Mishra, K. *et al.* 2012). Esto nos indica la alta capacidad de los TTA para inhibir al radical DPPH.

Con respecto a materiales inorgánicos, los estudios para evaluar actividad antioxidante son escasos y por lo tanto, es difícil hacer una comparación adecuada. En este sentido, se encontraron valores de IC₅₀ para complejos de V, Mo y Ru entre los 40-80 µM ensayados en el método DPPH (Elsayed, S.A. *et al.* 2017).

IV.3.2. Técnica ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) para determinación de la actividad antioxidante

Los resultados de la técnica ABTS (Ilustración 17) muestran que los diferentes materiales tienen propiedades antioxidantes que se ven directamente influenciadas por la concentración, en concordancia con el método DPPH.

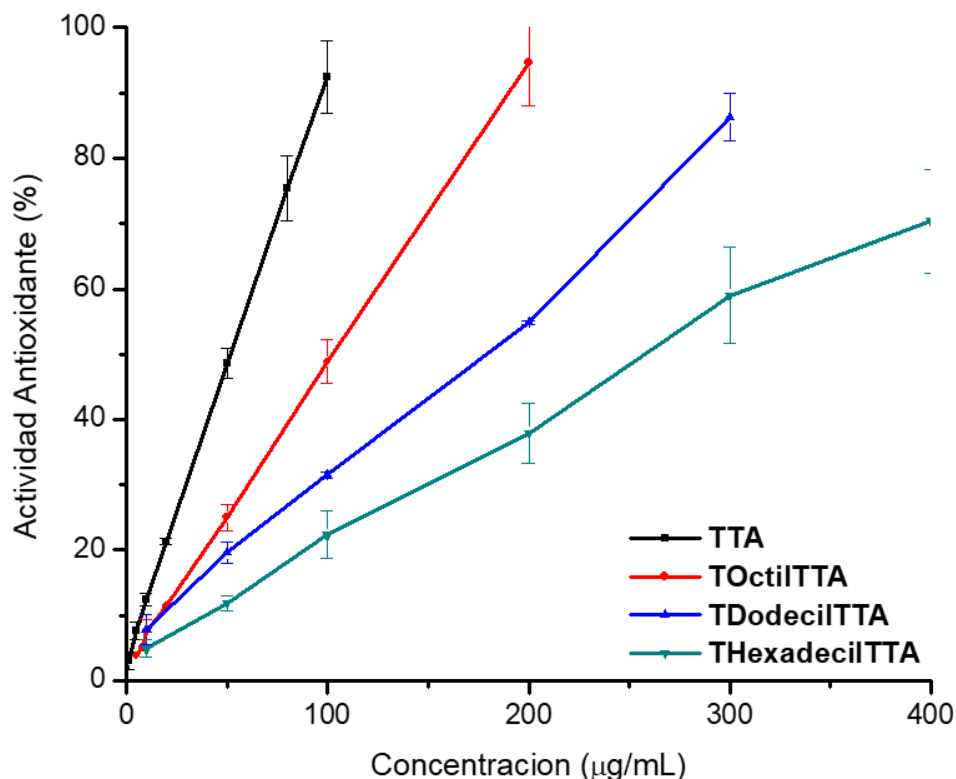


Ilustración 17.- Perfil de los TTA en el ensayo de ABTS. Curva de concentración vs actividad antioxidante.

A diferencia del método DPPH, esta técnica señala que el material con mayor captación de radicales es el material precursor, es decir, el TTA. Este material obtuvo un resultado IC_{50} de 52.24 µg/mL (150 µM) a diferencia de los TTA de alquiltrimetilamonio que mostraron un valor de IC_{50} de dos a cinco veces mayor. Esto se puede explicar en función de la polaridad de los TTA de alquiltriethylamonio, hay que considerar que el estudio se lleva a cabo en agua destilada, sin embargo, los TTA de alquiltrimetilamonio se disolvieron en una mezcla de agua-metanol por

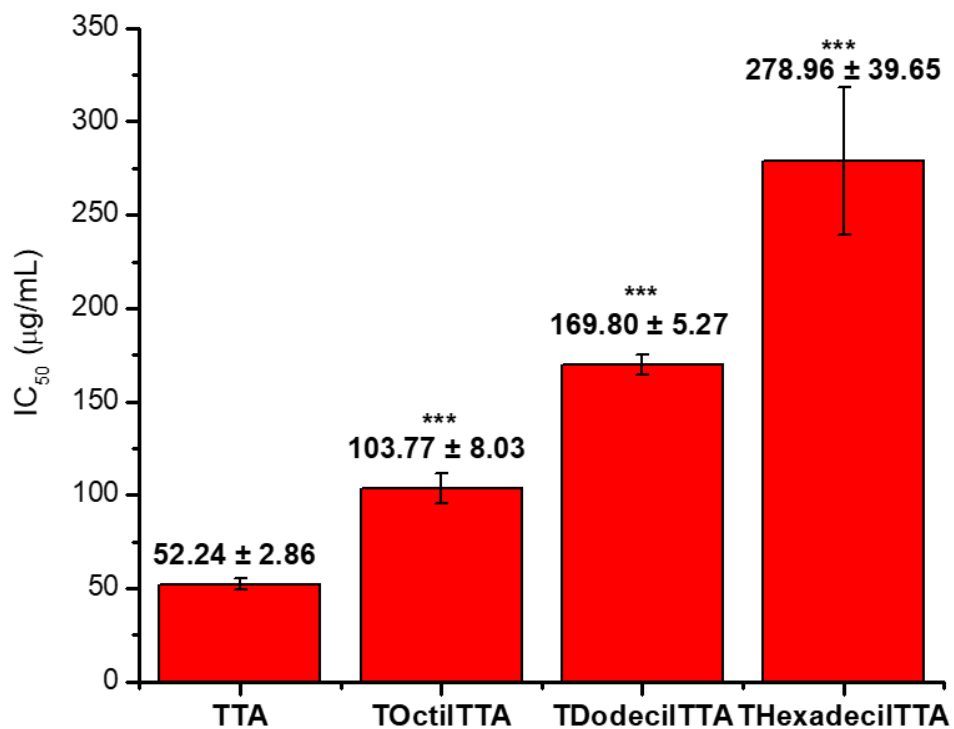
ser insolubles en agua. Estas diferencias de solubilidad podrían haber disminuido la interacción de los TTA con el catión radical, disminuyendo de esta forma, su capacidad antioxidante.

Los resultados obtenidos en la regresión lineal de los diferentes ensayos de la técnica ABTS se muestran en la Tabla 11, donde se expresa la actividad de captación de radicales de los distintos materiales en términos de IC₅₀ (µg/mL). Al igual que en el ensayo de DPPH, los resultados representan la media del experimento ± la SD de tres experimentos independientes.

Tabla 11.- Datos de calibración de los materiales antioxidantes analizados por el método ABTS.

Material	Ecuación de regresión (y = mx + b)	R ²	IC ₅₀ (µg/mL) ± SD
TTA	0.8993x + 3.1411	0.9998	52.24 ± 2.86
TOctilTTA	0.4644x + 1.9842	0.9997	103.77 ± 8.03
TDodecilTTA	0.2640x + 5.1827	0.9961	169.80 ± 5.27
THexadecilTTA	0.1720x + 4.0495	0.9941	278.96 ± 39.65

En la Ilustración 18 se muestra los resultados de IC₅₀ y el nivel de significancia estadística, donde se puede observar una diferencia significativa (**p<0.001) del TTA en comparación con los TTA con cadena alquílica. Como se observa, el TTA muestra la mayor capacidad de inhibir el radical ABTS. También se observa una tendencia a disminuir la actividad antioxidante en función del aumento de la longitud de la cadena alquílica.



*Ilustración 18.- Valores de IC₅₀ (µg/mL) de los materiales estudiados mediante la técnica ABTS. Se indica la significancia estadística de los TTA de alquiltrimetilamonio con respecto al material de referencia TTA (***)p<0.001).*

V. CONCLUSIÓN

Se sintetizó el precursor TTA, así como una familia de TTA de alquiltrimetilamonio con cadenas alquílicas con una longitud de 8, 12 y 16 carbonos. Dichos materiales fueron caracterizados mediante espectrometría FT-IR y UV-Vis, las cuales indican y confirman la presencia del enlace W-S y la incorporación de carbono para el caso de los TTA con carbono.

Se encontró que los materiales estudiados eran activos en la captación de radicales libres en los métodos *in vitro* DPPH y ABTS. Los resultados de IC₅₀ indican que tienen alta actividad antioxidante en comparación con los resultados encontrados en la bibliografía. Los mejores valores se encontraron para el método DPPH donde se observó que los TTA modificados con carbono exhibían una actividad antioxidante mejorada, en comparación con el TTA, destacándose el material TDodecilTTA con IC₅₀ de 4.14 µg/mL (5.39 µM).

Este trabajo es una aportación en el estudio de las propiedades biológicas-terapéuticas de las tiosales de tungsteno. Se espera que esta investigación anteceda ensayos de actividad antioxidante donde se exploren diferentes cadenas alquílicas de longitudes entre 4 y 12 carbonos, buscando una buena relación estabilidad-actividad, antioxidante-solubilidad. A su vez, los materiales podrían probarse en líneas celulares o en modelos *in vivo* para entender su mecanismo de acción en sistemas biológicos.

VI. REFERENCIAS

Aggarwal, A., Bhatt, M. (2018). Advances in Treatment of Wilson Disease. Tremor Other Hyperkinet Mov., 8, 525.

Aguilar-Cuevas, O., Castro-Ramírez, R., Sánchez-García, J.J., López-Sandoval, H., Barba-Behrens, N. (2012). Química Inorgánica Medicinal: vanadio, platino, oro. Educ. quím., 23(1), 33-40.

Alain Macedo-Marquez. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 15(2), 97-103.

Alam Md.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21, 143-152.

Al-Hilli, A.A., Evans, B.L. (1972). The preparation and properties of transition metal dichalcogenide single crystals. J. Cryst. Growth. 15, 93-101.

Alonso, G., Aguirre, G., Rivero, I.A., Fuentes, S. (1998). Synthesis and characterization of tetraalkylammonium thiomolibdates and thiotungstates in aqueous solution. Inorg. Chim. Acta., 274,108-110.

Alonso, G., Yang, J., Siadati, M.H., Chianelli, R.R. (2001). Synthesis of tetraalkylammonium thiomolibdates in aqueous solution. Inorg. Chim. Acta., 325, 193-197.

Alonso, G., Siadati, M., Berhault, G., Aguilar, A., Fuentes, S., Chianelli, R. (2004). Synthesis of tetraalkylammonium thiomolibdate precursors and their concurrent in situ activation during hydrodesulfurization of dibenzothiophene. Applied Catalysis A: General, 263(1), 109–117.

Bartozs, G. (2009) Reactive Oxygen species: destroyers or messengers? Biochemical Pharmacology, 77(8),1303.

Blois, M.S. (1958). Determinaciones de antioxidantes por el uso de un radical libre estable. Nature, 181(4617), 1199–1200.

Brewer, G.J., Dick, R.D., Yuzbasiyan-Gurkin, V., Tankanow, R., Young, A.B., and Kluin, K.J. (1991) Initial therapy of patients with Wilson's disease with tetrathiomolybdate. Arch. Neurol., 48, 42–47.

Brewer, G.J., Dick, R.D., Grover, D.K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M. Pienta, K., Redman, B.G., Jahan, T., Sondak, V.K., Strawderman, M., LeCarpentier, G. Merajver, S.D. (2000). Treatment of Metastatic Cancer with Tetrathiomolybdate, an

Anticopper, Antiangiogenic Agent: Phase I Study. *Clinical Cancer Research*, (6)1, 1-10.

Brewer, G.J. (2003). Copper-lowering therapy with tetrathiomolybdate for cancer and diseases of fibrosis and inflammation. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 16(4), 191 – 199.

Brewer, G.J., Askari, F., Lorincz, M.T., Carlson, M., Schilsky, M., Kluin, K.J., Hedera, P., Moretti, P., Fink, J.K., Tankanow, R., Dick, R.B., Sitterly, J. (2006). Treatment of Wilson disease with ammonium tetrathiomolybdate: IV. Comparison of tetrathiomolybdate and trientine in a double-blind study of treatment of the neurologic presentation of Wilson disease. *Arch. Neurol.*, 63(4), 521-527.

Candia, R., Clausen B.J, Topsoe, H. (1981). On the role of promoter atoms un unsupported hydrodesulfurization catalysts: influence of preparation methods. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 90(12), 1225-1232.

Cardoso C.L., Silva H.S, Castro-Gamboa Ian., Bolzani V.S. (2005). New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 1353-1359.

Danks, D. M. (1988) Copper Deficiency in Humans. *Ann Rev Nutr.*, 8(2), 235–257.

Elejalde Guerra, J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna*, 18(6).

Elsayed, S.A., Noufal, A.M., El-Hendawy A.M. (2017) Synthesis, structural characterization and antioxidant activity of some vanadium(IV), Mo(VI)/(IV) and Ru(II) complexes of pyridoxal Schiff base derivatives. *J. Mol. Struc.*, 1144, 120-128.

Fuentes, S., Díaz, G., Pedroza, F., Rojas, H., Rosas, N. (1988). The influence of a new preparation method on catalytic properties of CoMo and NiMo sulfides. *J. Catal.*, 113, 535-539.

George, G.N., Pickering, I.J., Harris, H.H., Gailer, J., Klein, D., Lichtmanegger, J., Summer, K.H. (2003). Tetrathiomolybdate Causes Formation of Hepatic Copper–Molybdenum Clusters in an Animal Model of Wilson’s Disease. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(7), 1704–1705.

Hagenbach, G., Courty, P., Delmon, B. (1973). Physicochemical investigations and catalytic activity measurements on crystallized molybdenum sulfide-cobalt sulfide mixed catalysts. *J. Catal.* 31, 264-273.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1999). *Radicales libres en biología y medicina*. Oxford University Press, Oxford, 1-25.

- Hou, G., Dick, R., Zeng, C., Brewer, G.J. (2007). Antitumor and antiinflammatory effects of tetrathiotungstate in comparison with tetrathiomolybdate. *Translational Research*, 149(5), 260-264.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Kyu Kwang Kim, K.K., Lange, T.S., Singh, R.K., Brard, L., Moore, R.G. (2012). Tetrathiomolybdate sensitizes ovarian cancer cells to anticancer drugs doxorubicin, fenretinide, 5-fluorouracil and mitomycin C. *BMC Cancer*, 12, 147.
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.-G., Ghanbari, H. (2013). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(12), 24438–24475.
- Mayor-Oxilia, R. (2010). Estres oxidativo y sistema de defense antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5(2) 23-29.
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- Ndhlala, A., Moyo, M., Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules. *Journal Molecules*, 15, 6905-6930.
- Pecoraro, T.A., & Chianelli, R.R. (1981) Hydrodesulfurization Catalysis by Transition Metal Sulfides. *Journal Catalysis*, 67(2), 430-445.
- Ramanathan, K., Weller, S.W. (1985). Caracterizacion de catalizadores de sulfuro de tungsteno. *Journal of Catalysis*, 95, 249-259.
- Re, R., Pellegrini, Ni., Proteggente, A., Pannala, A., Yang M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Redman, B.G., Esper, P., Pan, Q., Dunn, R.L., Hussain, H.K., Chenevert, T., Brewer, G.J., Merajver, S.D. (2003). Phase II Trial of Tetrathiomolybdate in Patients with Advanced Kidney Cancer. *Clinical Cancer Research*, 9, 1666-1672.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205, 698-699.
- Sahota, S., Kornhauser, N., Willis, A., Ward, M.M., Cigler, T., Moore, A., Andreopoulou, E., Fitzpatrick, V., Schneider, S.E., Wiener, A., Rubinchik, A., Lee, S., Lane, M.E., Mittal, V., Vahdat, L.T. A phase II study of copper-depletion using tetrathiomolybdate (TM) in patients (pts) with breast cancer (BC) at high risk for recurrence: Updated results. *Journal of Clinical Oncology*, 35(15), 2557.

Topsoe, H., Clausen, B.S., Massoth, F.E. (1996). A review of: "Hydrotreating catalysis science and technology". *Fuel Science and Technology International*, 14(10), 1465–1465.

Weisser, O. & Landa, S. (1973). *Sulfide catalysts: their properties and applications*. Pergamon press, Oxford, N.Y.

Van Senden, K.G. (1965). Analysis of N-alkyltrimethylammonium halides by gas chromatography and infrared spectroscopy with isotope substitution of the nitrogen atom. *Recueil*, 84, 1459-1465.

Vaquero-Raya, E.C., Molero-Richard, X. (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 473–484.

Zuleta, A., Esteve, M., Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

Donald, L. P., Gary, M. L., George, S. K., James, R. V. (2009). *Introduction to Spectroscopy*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Fourth Edition. Pag. 15-30.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, McGraw-Hill. 5ta Edición. Pag. 123-147

ANEXO 1 – Espectroscopia UV-Vis e IR

La radiación electromagnética se define como la difusión de la energía en un espacio sin soporte de materia, es decir, por medio de ondas producidas por la fluctuación o aceleración de una carga eléctrica.

La interacción entre la materia y la radiación electromagnética, involucra fenómenos ópticos como la absorción, transmisión, reflexión, refracción o dispersión. Para que ocurra dicha interacción es necesario que la longitud de onda sea del mismo o menor tamaño que las dimensiones del cuerpo irradiado.

ESPECTROSCOPIA UV-Visible

La absorción de radiación ultravioleta o visible resulta de las transiciones dadas en los electrones de enlace (π , σ) y no enlazantes (n), como se observa en la Ilustración 19. Esta transición ocurre al llevar un electrón a un grado de excitación (antienlazante) que, para cada especie química, implica un pico de absorción propio que puede ser correlacionado con los tipos de enlaces de las especies que son objeto de estudio. De esta manera, la espectroscopia de absorción molecular es válida para la identificación de grupos funcionales en una molécula.

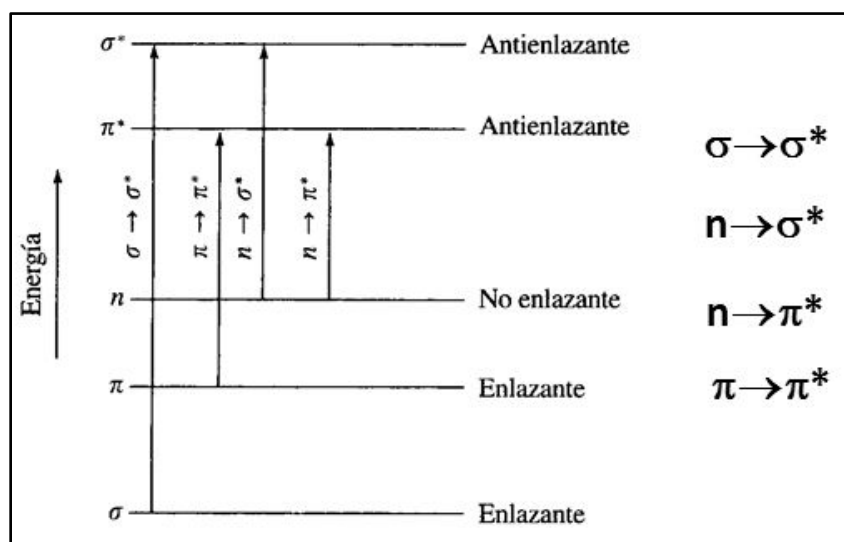


Ilustración 19.- Transiciones electrónicas entre niveles de energía moleculares.

Además, con la espectroscopia UV-Vis es posible determinar la cantidad de radiación electromagnética que puede absorber o transmitir una sustancia en una muestra en función de la concentración de la misma. Esta proporcionalidad entre intensidad de luz absorbida o transmitida y la concentración de analito viene definida por la ley de Lambert-Beer.

Para realizar un análisis usando radiación UV-vis se utiliza un instrumento denominado espectrofotómetro. Este equipo mide la intensidad de la luz que pasa a través de una muestra y la compara con la intensidad de luz antes de atravesarla. La relación encontrada se denomina transmitancia, la cual se expresa como un porcentaje (%T). A su vez, la absorbancia (A) se relaciona con la transmitancia como se expresa en la siguiente ecuación.

$$A = -\log(\%T) \quad (1)$$

El esquema de la Ilustración 20 representa la parte interna del instrumento de medición UV-vis.

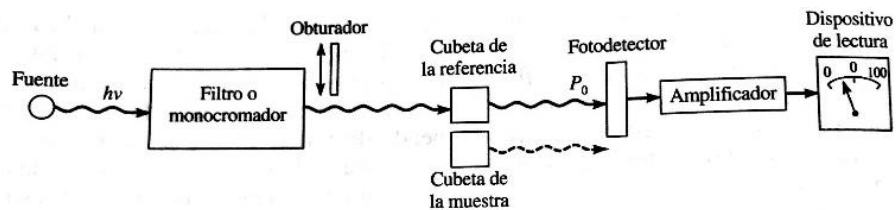


Ilustración 20.- Diseño instrumental para espectrofotómetro de haz sencillo.

Este equipo consta de una fuente de luz policromática donadora de fotones, los cuales, después de pasar por un filtro óptico, fijan la longitud de onda que incide en la muestra. Posteriormente, la luz transmitida por la muestra es focalizada por un segundo filtro óptico para después llegar al fotodetector que recibe la señal de la intensidad de luz transmitida a cada longitud de onda y la amplifica para finalmente transformarla en una señal eléctrica que puede ser procesada por un ordenador.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Los espectros de absorción, emisión y reflexión en espectroscopia infrarroja se pueden explicar asumiendo que todos los resultados son producidos debido a los distintos cambios energéticos creados por transiciones moleculares de tipo vibracional o rotacional.

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son fijas, sino que fluctúan con regularidad a consecuencia de varios tipos de vibraciones y rotaciones alrededor de los enlaces en la molécula. Las vibraciones se pueden dividir en dos categorías de tensión y de flexión, las cuales pueden observarse en la Ilustración 21.

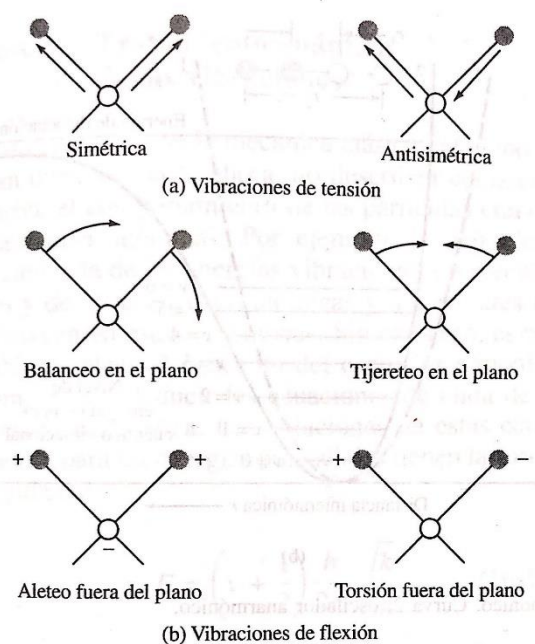


Ilustración 21.- Tipos de vibraciones moleculares.

Por lo general, la longitud de onda se ve representada en nanómetros. Sin embargo, en la técnica infrarroja, la radiación electromagnética es descrita en términos de número de onda y expresada en cm^{-1} .

Para medir la absorción generada por un haz de luz infrarrojo existen 3 tipos de instrumentos. En este trabajo se empleó un espectrómetro de transformada de Fourier, el esquema de este equipo se observa en la Ilustración 22.

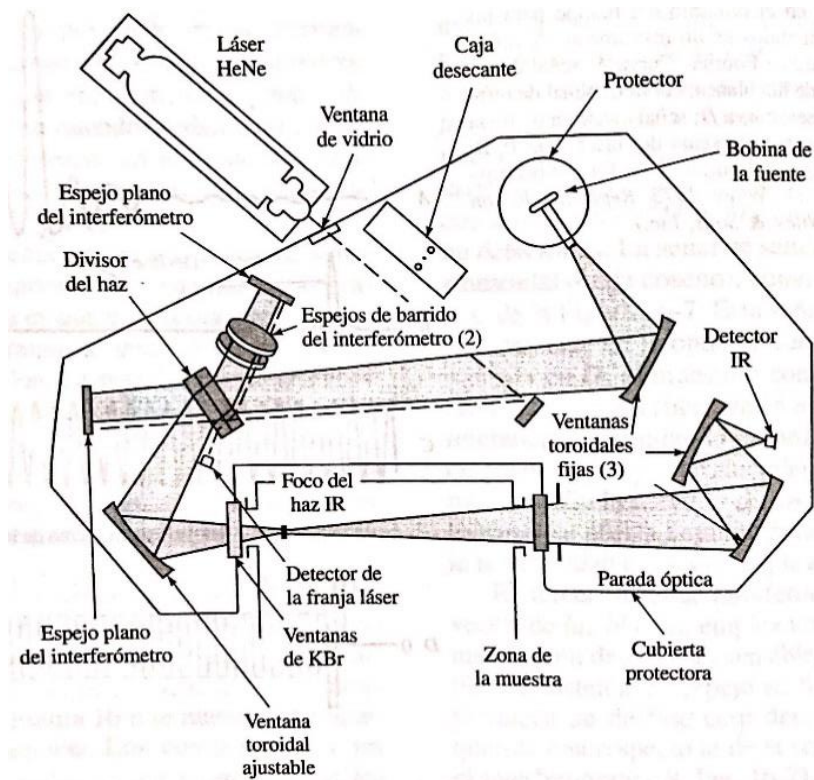


Ilustración 22.- Espectrómetro FTIR de un solo haz.

El proceso de este instrumento para determinar la transmitancia o la absorbancia consiste en obtener un interferograma de referencia mediante una serie de barridos a un compuesto establecido como referencia, en el caso de este trabajo, KBr. Posteriormente, se coloca la muestra a analizar en la trayectoria de la radiación y se repite la serie de barridos. Finalmente, se calcula la relación entre los datos espectrales de la muestra y la referencia, obteniendo la transmitancia a distintas frecuencias.

ANEXO 2 - ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Diagrama del proceso denominado estrés oxidativo.....	1
Ilustración 2. Esquema de producción del radical hidroxilo durante la reducción de oxígeno molecular.....	3
Ilustración 3. Esquema del mecanismo de los antioxidantes para estabilizar a un radical libre.....	4
Ilustración 4. Estructura de la especie radical DPPH antes y después de la reacción con la especie antioxidante.....	7
Ilustración 5. Estructura de la molécula ABTS antes y después de reaccionar con la especie antioxidante.....	8
Ilustración 6. El TMA tiende a formar especies con el cobre por dos de sus ligandos de azufre.....	11
Ilustración 7. (A) Sistema base para la síntesis del TTA. (B) Baño de hielo para inducir la cristalización. (C) Cristales característicos del TTA.....	16
Ilustración 8. Esquema sobre el proceso de recuperación de los tiosulfatos de alquiltrimetilamonio.....	19
Ilustración 9. (A) Equipo para pretratamiento a la muestra para análisis FTIR. (B) Pastilla traslúcida lista para medición.....	20
Ilustración 10. Espectrómetro DR600.....	21
Ilustración 11. Mecanismo de reacción de la molécula DPPH al reaccionar con el compuesto antioxidante.....	22
Ilustración 12. Mecanismo de reacción de la molécula ABTS al reaccionar con el compuesto antioxidante.....	24
Ilustración 13. Espectro FTIR para los TTA sintetizados.....	30
Ilustración 14. Espectro de absorbancia UV-Vis obtenido de los TTA.....	32

Ilustración 15. Perfil de los TTA en el ensayo de DPPH. Curva de concentración vs actividad antioxidante.....	33
Ilustración 16. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) de los materiales estudiados mediante la técnica DPPH.....	35
Ilustración 17. Perfil de los TTA en el ensayo de ABTS. Curva de concentración vs actividad antioxidante.....	36
Ilustración 18. Valores de IC ₅₀ (µg/mL) de los materiales estudiados mediante la técnica ABTS.....	38
Ilustración 19. Transiciones electrónicas entre niveles de energía moleculares.....	44
Ilustración 20. Diseño instrumental para espectrofotómetro de haz sencillo.....	45
Ilustración 21. Tipos de vibraciones moleculares.....	46
Ilustración 22. Espectrómetro FTIR de un solo haz.....	47

ANEXO 3 - ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los métodos de ensayo in vitro para determinar la actividad antioxidante según su mecanismo de reacción.....	6
Tabla 2. Descripción de los reactivos utilizados para la síntesis de los materiales de estudio.....	15
Tabla 3. TTA modificados con una cadena alquílica.....	17
Tabla 4. Reactivos y cantidades utilizadas para las síntesis de los tiotungstatos de alquiltrimetilamonio.....	18
Tabla 5. Concentraciones donde se encontró un perfil lineal en la reacción con el DPPH.....	23
Tabla 6. Concentraciones donde se encontró un perfil lineal en la reacción con el ABTS.....	25
Tabla 7. Rendimiento de las reacciones.....	29
Tabla 8. Señales de absorción obtenidas en el ensayo FTIR para los TTA.....	31
Tabla 9. Intensidad de las señales comparadas en relación a la proporción carbono-tungsteno.....	32
Tabla 10. Datos obtenidos de la curva de calibración de los materiales antioxidantes analizados por el método in vitro DPPH.....	34
Tabla 11. Datos de calibración de los materiales antioxidantes analizados por el método ABTS.....	37