

Efecto del pH en el carácter antioxidante del ácido úrico sobre el triptófano

Santiago González Pérez

Trabajo de Grado para optar al título de Químico

Director

Enrique Mejía Ospino

Doctor en Ciencias Químicas

Codirector

Leonardo Muñoz Rugeles

Doctor en Ciencias Químicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2024

## **Dedicatoria**

*Para mis tres pilares:*

*Origen, Legado y Vida.*

### **Agradecimientos**

Muchas gracias, primeramente, a mi madre y origen, Gloria Pérez y a mi legado Salomé González, las mujeres que me cuidaron en todo este proceso, quienes me apoyaron siempre en cuanto les fue posible y me aguantaron cuando me ponía de los nervios.

Muchas gracias a Camila Valdivieso, Andrés Cabezas, Mario Castellanos y Sara Herrera por quererme, escucharme, cuestionarme, interesarse y siempre estar ahí. Son los mejores amigos que pude desear.

Muchas gracias a mi director, el profe Enrique Mejía, por apoyarme en conocimiento y economía desde que me conoció, ser supremamente amable como pensé que un director jamás lo sería y siempre aportarme más en este proceso.

Muchas gracias a mi codirector, el profe Leonardo Muñoz, quien me concedió el honor de continuar con su investigación, quien me apoyó desde el primer día, quien creyó y se preocupó por mí, quien siempre me recibió con una sonrisa y me motivó a seguir. Lo admiro mucho profe.

Muchas gracias al LEAM, la familia científica que me acogió como si hubiésemos crecido juntos, a la escuela de Química por proporcionar, recursos, material y equipos necesarios y a la UIS, mi alma mater, a la que espero devolver con creces cuanto me permitió vivir.

Y finalmente, muchísimas gracias a Derly Rojas, quien me sacó del hoyo en múltiples ocasiones, quien me escuchó llorar cuando los experimentos no daban, quien siempre encontró la manera de estar ahí, quien me conoce más que nadie y a quien tengo la dicha de llamar mi mujer.

Esto es para todos ustedes, muchas gracias.

**Tabla de Contenido**

<b>1. Introducción</b>	<b>16</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>20</b>
3.1. Radicales libres . . . . .	20
3.1.1. Especies reactivas en el organismo . . . . .	22
3.1.1.1. Radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) . . . . .	22
3.1.1.2. Radical hidropéroxido ( $HOO^{\bullet}$ ) . . . . .	22
3.1.1.3. Peróxido de hidrógeno ( $HOOH$ ) . . . . .	22
3.1.1.4. Radical óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) . . . . .	23
3.1.1.5. Radical dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ ) . . . . .	23
3.1.1.6. Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) . . . . .	23
3.1.1.7. Ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) . . . . .	24
3.1.1.8. Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) . . . . .	24
3.1.1.9. Radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) . . . . .	24
3.2. Estrés oxidativo . . . . .	25
3.3. Envejecimiento . . . . .	26
3.4. Triptófano . . . . .	27

3.4.1. Metabolitos del triptófano . . . . .	28
3.4.2. Fotoxidación del triptófano . . . . .	29
3.5. Fotoxidación . . . . .	31
3.6. Antioxidantes . . . . .	32
3.7. Ácido úrico . . . . .	32
3.7.1. Caracter antioxidante del ácido úrico . . . . .	33
3.8. Mecanismo de reacción . . . . .	34
3.8.1. Posibles mecanismos de reacción entre un radical aminoacídico y un antioxidante . . . . .	35
3.8.1.1. Transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) . . . . .	35
3.8.1.2. Transferencia electrónica y protónica acoplada (PCET) . . . . .	36
3.8.1.3. Transferencia secuencial electrón-protón (EPST) . . . . .	36
3.8.1.4. Transferencia secuencial protón-electrón (PEST) . . . . .	37
3.8.1.5. Perdida protónica y transferencia electrónica secuencial (SPLET) . . . . .	37
3.8.1.6. Ganancia protónica y transferencia electrónica secuencial (SPGET) . . . . .	38
3.9. Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) . . . . .	39
<b>4. Metodología</b>	<b>41</b>
4.1. Reactivos . . . . .	41
4.2. Equipos . . . . .	41
4.3. Fases metodológicas . . . . .	41
4.3.1. Fase 1: Curvas de calibración . . . . .	41

4.3.2. Fase 2: Oxidación del triptófano . . . . .	42
4.3.3. Fase 3: Oxidación del ácido úrico . . . . .	43
4.3.4. Fase 4: Oxidación de triptófano con ácido úrico . . . . .	43
<b>5. Análisis de resultados y discusión</b>	<b>45</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>60</b>
<b>7. Recomendaciones</b>	<b>62</b>
<b>8. Trabajo futuro</b>	<b>62</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>62</b>
<b>Apéndices</b>	<b>71</b>

**Lista de Figuras**

Figura 1.	Producción del radical superóxido via catabolismo de purinas . . . . .	21
Figura 2.	Formación del radical óxido nítrico . . . . .	23
Figura 3.	Estructura química del triptófano con sus grupos funcionales indol (verde), amino (azul) y carboxilo (rojo) . . . . .	28
Figura 4.	Valores pKa del L-triptófano . . . . .	28
Figura 5.	Principales metabolitos del triptófano . . . . .	29
Figura 6.	Valor pKa del equilibrio entre los radiales $TrpH^{\bullet+}$ y $Trp^{\bullet}$ . . . . .	30
Figura 7.	Principales metabolitos del radical $Trp^{\bullet}$ . . . . .	30
Figura 8.	Valores pKa del ácido úrico . . . . .	33
Figura 9.	Creación de las curvas de calibración para cada pH . . . . .	42
Figura 10.	Proceso de fotoxidación del triptófano . . . . .	43
Figura 11.	Proceso de fotoxidación del ácido úrico . . . . .	44
Figura 12.	Proceso de fotoxidación del triptófano y ácido úrico . . . . .	44
Figura 13.	Curva de calibración de TrpH a pH 4 . . . . .	45
Figura 14.	Curva de calibración de TrpH a pH 4,5 . . . . .	46
Figura 15.	Curva de calibración de TrpH a pH 5 . . . . .	47
Figura 16.	Curva de calibración de TrpH a pH 5,5 . . . . .	48

Figura 17.	Curva de calibración de TrpH a pH 6 . . . . .	49
Figura 18.	Curva de calibración de TrpH a pH 6,5 . . . . .	50
Figura 19.	Curva de calibración de TrpH a pH 7 . . . . .	51
Figura 20.	Fracción de TrpH residual ( $X_n$ ) a diferentes valores de pH tras fotoxidación . . .	52
Figura 21.	Espectro UV-Vis del AU tras fotoxidación . . . . .	53
Figura 22.	Fracción de TrpH residual ( $X_n$ ) a diferentes valores de pH tras fotoxidación en presencia de AU . . . . .	54
Figura 23.	Fracciones de ácido úrico y radicales de triptófano presentes en el medio a diferentes valores de pH . . . . .	55
Figura 24.	Cromatogramas de las curvas de calibración del triptófano . . . . .	71
Figura 25.	Cromatogramas de las soluciones fotoxidadas con solo triptófano . . . . .	72
Figura 26.	Cromatogramas de las soluciones fotoxidadas con triptófano y ácido úrico . . .	73
Figura 27.	Espectros UV-Vis de las soluciones de TrpH con AU tras fotoxidación . . . . .	74
Figura 28.	Constantes de velocidad $k$ obtenidas por Muñoz (2017) . . . . .	75

**Lista de Tablas**

Tabla 1.	Procesos metabólicos que generan especies reactivas como subproducto . . . . .	21
Tabla 2.	Especies radicalarias y fracciones antioxidantes presentes en cada pH . . . . .	56
Tabla 3.	Valores de $X_n$ tras la fotoxidación (por 60 min) del TrpH solo y en presencia de AU . . . . .	56
Tabla 4.	Valores de $k$ a diferentes pHs . . . . .	58

**Lista de Apéndices**

	<b>pág.</b>
Apéndice A. Cromatogramas de las curvas de calibración . . . . .	71
Apéndice B. Cromatogramas de la fotoxidación de soluciones de TrpH . . . . .	72
Apéndice C. Cromatogramas de la fotoxidación de soluciones de TrpH en presencia de AU	73
Apéndice D. Espectros UV-Vis de las soluciones de TrpH con AU tras 60 min de fotoxi- dación . . . . .	74
Apéndice E. Valores de k obtenidos por Muñoz (2017) . . . . .	75

### Abreviaturas

*AH* Antioxidante

*A•* Radical proveniente del antioxidante

*AU* Ácido Úrico

*EPST* Mecanismo de reacción de transferencia secuencial electrón-protón (*electron-proton sequential transfer*)

*ER* Especie reactiva

*ERCA* Especie reactiva de capa abierta

*ERCC* Especie reactiva de capa cerrada

*ERO* Especie reactiva de oxígeno

*ERN* Especie reactiva de nitrógeno

*FHT* Proceso de transferencia formal de hidrógeno (*formal hydrogen transfer*)

*HAT* Mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (*hydrogen atom transfer*)

*H<sub>3</sub>Ur* Fracción triprotonada del ácido úrico

*H<sub>2</sub>Ur<sup>-</sup>* Fracción biprotonada del ácido úrico

*HUr<sup>2-</sup>* Fracción monoprotonada del ácido úrico

*PCET* Mecanismo de reacción de transferencia electrónica y protónica acoplada (*proton coupled-electron transfer*)

*PEST* Mecanismo de reacción de ganancia protónica y transferencia electrónica secuencial (*proton gain-electron sequential transfer*)

*PT* Proceso de transferencia protónica (*proton transfer*)

*R* Especie radicalaria estable (con los electrones apareados)

*R*<sup>•</sup> Radical libre

*SAPG* Proceso de ganancia protónica asistida por solvente (*solvent assisted proton gain*)

*SAPL* Proceso de pérdida protónica asistida por solvente (*solvent assisted proton loss*)

*SET* Proceso de transferencia electrónica singular (*single electron transfer*)

*SPGET* Mecanismo de reacción de ganancia protónica y transferencia electrónica secuencial (*sequential proton gain-electron transfer*)

*SPLET* Mecanismo de reacción de pérdida protónica y transferencia electrónica secuencial (*sequential proton loss-electron transfer*)

*TrpH* Triptófano

*TrpH*<sup>•+</sup> Cation radical de triptófano

*Trp*<sup>•</sup> Radical neutro de triptófano

### Glosario

**Afección** También conocida como enfermedad, es un estado producido en un ser vivo por la alteración de las funciones de uno de sus órganos o de todo el organismo.

**Antioxidación** Proceso que previene o revierte la oxidación de una especie química.

**Aminoácido** Sustancia química en cuya composición molecular se encuentran un grupo amino y otro carboxilo.

**Capacidad antioxidante** También conocida como carácter antioxidante, es la medida de la eficiencia con la que un antioxidante previene la oxidación de una especie química específica.

**Catabolismo** Conjunto de procesos metabólicos de degradación de sustancias para obtener otras más simples.

**Metabolismo** Conjunto de reacciones químicas que efectúan las células de los seres vivos con el fin de sintetizar o degradar sustancias.

**Metabolito** Sustancia química producto del metabolismo.

**Organismo** Ser vivo, animal o vegetal, compuesto por un conjunto de órganos especializados necesarios para su existencia.

### Resumen

**Título:** Efecto del pH en el carácter antioxidante del ácido úrico sobre el triptófano \*

**Autor:** Santiago González Pérez \*\*

**Palabras clave:** Ácido Úrico, Carácter antioxidante, Fotoxidación, HPLC-FLD, pH, Triptófano.

Investigaciones computacionales han formulado la hipótesis de que la capacidad antioxidante del ácido úrico puede depender de cambios en el pH, por esto, este proyecto se enfocó en la evaluación de la capacidad antioxidante que tiene el ácido úrico (AU) sobre en triptófano (TrpH) en función del pH. Para esto, primeramente, se verificó que el AU no pudiese fotooxidarse, seguido de ello, se fotoxidaron soluciones de TrpH con y sin AU en pHs de 4 a 7, y se observó la fracción residual de TrpH tras 10, 30 y 60 min de irradiación con luz UV de 255 nm. Con esta información fue posible; determinar que el ritmo de fotoxidación del TrpH es menor en todas las soluciones con AU comparadas con sus soluciones equivalentes sin el antioxidante. Así como también señalar que, a pHs menores a 5.5, el AU muestra mayor capacidad antioxidante. A su vez, estimar el valor de la constante de velocidad de la reacción en cada pH y, finalmente, conjeturar que el mecanismo de reacción SPGET es el más probable para la reacción dadas las condiciones de los experimentos.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino, Doctor en Ciencias Químicas. Codirector: Leonardo Muñoz Rugeles, Doctor en Ciencias Químicas.

### Abstract

**Title:** Effect of pH on the antioxidant character of uric acid on tryptophan \*

**Author:** Santiago González Pérez \*\*

**Keywords:** Antioxidant Character, HPLC-FLD, pH, Photoxidation, Tryptophan, Uric Acid.

Computational research has formulated the hypothesis that the antioxidant capacity of uric acid can be influenced by changes in pH, therefore, this research focused on the evaluation of the antioxidant capacity that uric acid (UA) has on tryptophan (TrpH) as a function of pH. For this, firstly, it was verified that the UA could not be photoxidized, furthermore, solutions of TrpH were photoxidized with and without UA at pHs of 4 to 7, and residual fraction of TrpH was observed after 10, 30 and 60 min of exposure to UV light of 255 nm. In conclusion, with this information it was possible to; determine that the photoxidation rate of TrpH is lower in all solutions with UA compared to their equivalent solutions without the antioxidant. Also, to determine that, at pHs lower than 5.5, the UA is more efficient in preventing photoxidation. Afterwards, to estimate the constant rate of the antioxidation reaction at each pH and, finally, to consider the SPGET reaction mechanism as the most probable given the conditions of the experiments.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Enrique Mejía Ospino, Doctor en Ciencias Químicas. Codirector: Leonardo Muñoz Rugeles, Doctor en Ciencias Químicas.

## 1. Introducción

La gran mayoría de moléculas que se encuentran en un organismo pueden verse expuestas a situaciones donde su integridad estructural se ve comprometida, este es el caso de la conversión de moléculas estables en especies reactivas, las cuales son moléculas con uno (radicales libres) o más (especies reactivas de capa abierta o cerrada) electrones desapareados. Una vez ocurridas las alteraciones estructurales (que en adelante se enunciarán como oxidación), las moléculas comprometidas suelen propagar el daño hacia moléculas vecinas (Andreoli, 2011), las cuales, igual que la molécula inicialmente afectada, son incapaces de llevar a cabo las funciones normales en el organismo causando desde inflamación, dolor en huesos y articulaciones, hasta agravamiento de enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer, este conjunto de afecciones están altamente relacionadas con el estrés oxidativo, fenómeno en el que la concentración de especies reactivas es excesiva en el cuerpo (Camps, 2010).

Con el paso del tiempo, un organismo se vuelve menos eficiente a la hora de combatir especies reactivas, lo que causa una acumulación progresiva de estas mismas dentro de sí, reduciendo e incluso anulando ciertas funciones biológicas, proceso al que se le conoce como envejecimiento (Cannon, 2015). El envejecimiento ha sido estudiado ampliamente, motivo por el cual se tiene evidencia de que, entre otras muchas causas complementarias, este tiene sus raíces en la oxidación del ADN, proteínas e incluso aminoácidos entre los que se encuentra el triptófano (Preiser, 2012).

El triptófano es uno de los 20 aminoácidos esenciales para la vida tal como la conocemos ya que es el precursor de moléculas como la melatonina y la serotonina, reguladores naturales

de ciclos biológicos como lo son el sueño y el apetito, además de ser responsables de reacciones naturales al entorno, como lo son el dolor, el miedo o el placer (Berger et al., 2009). Dado el ambiente químico correcto, el triptófano puede oxidarse formando dos radicales cuya existencia depende del equilibrio entre ellos, el catión radical ( $TrpH^{\bullet+}$ ) y el radical neutro ( $Trp^{\bullet}$ ) (Connor et al., 2008).

Afortunadamente, existe una familia molecular capaz de contrarrestar las causas del estrés oxidativo, estas son conocidas como antioxidantes, moléculas que reaccionan con especies reactivas, estabilizándolas y previniendo la propagación del daño en el organismo (Halliwell, 1995). Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos y endógenos o exógenos, sin embargo, en este caso nos centraremos en una especie en particular, el ácido úrico. El ácido úrico es un importantísimo antioxidante endógeno, responsable de aproximadamente el 50 % de la antioxidación no enzimática de la sangre (Valenzuela, 2016), esto debido a que es capaz de neutralizar radicales libres muy reactivos (como el  $^1O_2$  y el  $OH^{\bullet}$ ) sin propagar el daño, es decir, formando un radical muy poco reactivo (Suzuki, 2007).

Sin embargo, existen estudios que plantean la posibilidad de que la capacidad antioxidante depende del ambiente químico, específicamente, de la acidez del medio, hecho extremadamente lógico debido a la protonación o deprotonación de las especies antioxidantes disponibles para mitigar el daño radicalario y al posible cambio en el mecanismo de reacción de antioxidación. Por esto, en este estudio se evaluó la capacidad antioxidante del ácido úrico sobre el triptófano a diferentes pH mediante el uso de una metodología basada en cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de fluorescencia y fotooxidación con lámpara de mercurio, para ello se ob-

servó el ritmo de oxidación del triptófano en solitario y en compañía del ácido úrico, se comparó la efectividad antioxidativa del ácido úrico sobre el triptófano en cada pH y se estimó la constante de velocidad para la reacción de antioxidación en cada pH, valor con el que se consideró uno de los cinco mecanismos de reacción propuestos por Muñoz (2017) como el más probable para esta reacción en específico.

## 2. Objetivos

### Objetivo general

Dilucidar el mecanismo de reacción presente en la antioxidación del triptófano, mediante el análisis del carácter antioxidante del ácido úrico sobre triptófano a diferentes pH.

### Objetivos específicos

- Definir una metodología basada en HPLC-FLD en fase reversa que permita observar la influencia del pH en el carácter antioxidante del ácido úrico sobre el triptófano.
- Ejecutar la metodología propuesta y relacionar el pH con el carácter antioxidante del ácido úrico sobre el triptófano.
- Estimar el valor de la constante de velocidad de reacción a cada pH y relacionarla con posibles mecanismos de reacción.

### 3. Marco teórico

#### 3.1. Radicales libres

Son una familia de moléculas cuya característica en común es la presencia de al menos un electrón desapareado, lo que las convierte en especies reactivas (ER), tanto así, que suelen atacar a cualquier tipo de molécula con la que se encuentren para abstraer el o los electrones faltantes y estabilizarse, convirtiendo a su vez a la molécula atacada en otro radical libre que repetirá el proceso de abstracción y propagará el daño (Andreoli, 2011). Cabe recalcar que las ER se dividen en dos categorías: radicales libres ( $R^\bullet$ ) y especies reactivas de capa cerrada (ERCC), además de ello, depende el elemento químico sobre el cual se encuentre el o los electrones desapareados, las ER pueden categorizarse como: especies reactivas de oxígeno (ERO), de nitrógeno (ERN) y de azufre (ERS).

Los radicales libres se generan de dos maneras principales: por causa de fuentes externas entre las que destacan el consumo excesivo de grasas animales y vegetales y la contaminación atmosférica (Finkel and Holbrook, 2000) y dentro de procesos metabólicos normales en cantidades moderadas.

Los procesos metabólicos de producción de radicales libres más importantes son probablemente: el catabolismo de las purinas (figura 1), en la cual, casi al final de la reacción catabólica global, la enzima xantino oxidasa, cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y posteriormente, a ácido úrico, produciendo, además, un radical superóxido por cada paso de la reacción (Alcaíno et al., 2011) y el paso por la cadena de transporte de electrones mitocondrial en la cual también

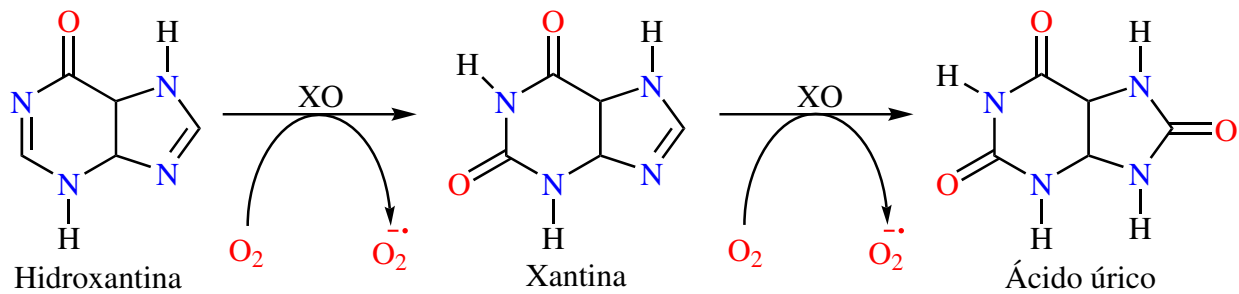


Figura 1. Producción del radical superóxido via catabolismo de purinas

Enzima involucrada	ER generada	Sección	Referencia Bibliográfica
Acil-CoA oxidasa	$H_2O_2$	3.1.1.3	Marotte and Zeni (2013)
Citocromo P450	$O_2^{\bullet-}$	3.1.1.1	Marotte and Zeni (2013)
D-amino ácido oxidasa	$H_2O_2$	3.1.1.3	Velasco (2019)
D-aspartato oxidasa	$H_2O_2$	3.1.1.3	Pomilio et al. (2013)
Hemoglobina	$O_2^{\bullet-}$	3.1.1.1	Corrales and Muñoz (2012)
L- $\alpha$ -hidroxi oxidasa	$H_2O_2$	3.1.1.3	Carbonero (1976)
Urato oxidasa	$H_2O_2$	3.1.1.3	Corrales and Muñoz (2012)
Lipooxigenasa	$OH^{\bullet}$	3.1.1.9	Companioni (1995)
NADPH oxidasa	$O_2^{\bullet-}$	3.1.1.1	Corrales and Muñoz (2012)
Óxido nítrico sintasa	$NO^{\bullet}$	3.1.1.4	Mata et al. (2010)

Tabla 1

*Procesos metabólicos que generan especies reactivas como subproducto*

se produce el radical superóxido (Macedo-Márquez, 2012), sin embargo, existen otros procesos metabólicos en los que las enzimas involucradas generan ER como subproducto, algunos de estos se resumen en la tabla 1.

Existen una inmensa cantidad de consecuencias cuando la concentración de radicales libres en el organismo aumenta demasiado, entre estas se encuentran: la alteración de las funciones celulares normales, la contribución en enfermedades degenerativas y la producción de afecciones como

la cardiomiopatía y algunas enfermedades neurológicas (Halliwell, 1999).

**3.1.1. Especies reactivas en el organismo.** Dentro de las especies radicalarias que pueden existir en el organismo, se encuentran principalmente las siguientes:

**3.1.1.1. Radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).** Como ya fue mencionado, esta ERO se forma principalmente por medio del catabolismo de purinas (figura 1), el paso por la cadena de electrones y otras reacciones enzimáticas. Además de esto, puede darse por medio de la reacción entre el  $Fe^{2+}$  y el  $^3O_2$  (ecuación 1) (Rifkind et al., 2003).



**3.1.1.2. Radical hidroperóxido ( $HOO^{\bullet}$ ).** Esta ERO se encuentra en equilibrio con el radical  $O_2^{\bullet-}$  ya que este puede reaccionar con los hidrogeniones del medio (ecuación 2) (De Grey, 2002).



**3.1.1.3. Peróxido de hidrógeno ( $HO_2H$ ).** A pesar de que esta especie no es directamente un  $R^{\bullet}$ , es una ERCC, por ende, resulta apropiado categorizarla como una ERO. El peróxido de hidrógeno resulta de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) entre el radical superóxido y el agua en presencia de oxígeno triplete (ecuación 3) (Sheng et al., 2014).



**3.1.1.4. Radical óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ).** De igual manera que con el radical  $O_2^{\bullet-}$ , esta ERN es un producto natural del metabolismo (Wei et al., 2003). En particular, la reacción de formación de este radical se da mediante la transformación de arginina en citrulina en presencia de la coenzima NADPH (figura 2).

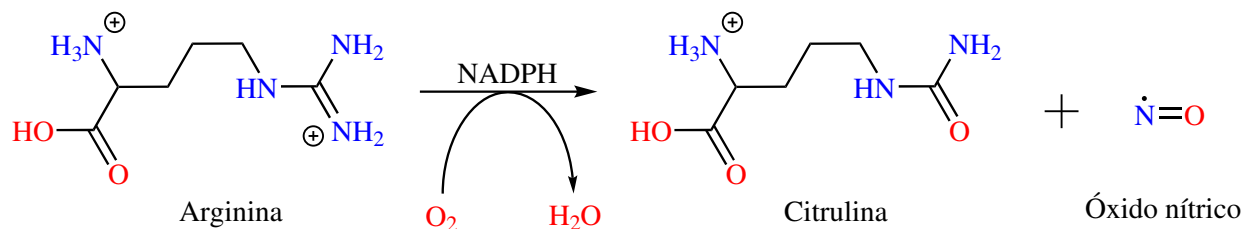
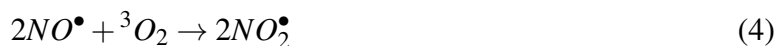
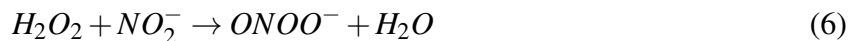


Figura 2. Formación del radical óxido nítrico

**3.1.1.5. Radical dióxido de nitrógeno ( $NO_2^\bullet$ ).** Este radical es la ERN mas reactiva en el organismo, se produce mediante la reacción del radical  $NO^\bullet$  y el  $^3O_2$  (ecuación 4) (Robinson and Beckman, 2005).



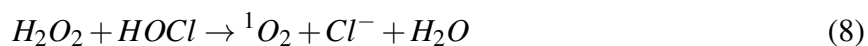
**3.1.1.6. Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).** Esta ERN es un anión el cual, a pesar de ser un isómero del anión  $NO_3^-$  no tiene nada que ver con él, ya que dos de sus oxígenos forman un enlace peróxido, lo que a su vez cambia las valencias y hace a la especie altísimamente reactiva. El peroxinitrito se forma de dos maneras diferentes en el organismo, pero ambas iniciadas por EROs y ERNs, la primera, por medio de la reacción entre  $O_2^{\bullet-}$  y  $NO^\bullet$  (ecuación 5) y la segunda por medio de la reacción entre  $H_2O_2$  y  $NO_2^-$  (Ecuación 6).



**3.1.1.7. Ácido hipocloroso (HOCl).** Esta ERCC es altísimamente reactiva, tanto que es capaz de oxidar nucleótidos, algunos aminoácidos y antioxidantes como el ácido úrico y el ácido ascórbico (Albrich et al., 1981), además de ser capaz de clorar aminas, lípidos insaturados e incluso el ADN (Prütz, 1996). Esta especie se obtiene de la reacción entre el  $H_2O_2$  y el  $Cl^-$  (ecuación 7).



**3.1.1.8. Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).** Esta ERO es de las especies químicas más reactivas del organismo, tanto así, que su interacción con los tejidos, proteínas y el ADN puede dañarlos seriamente (Davies, 2003), esto se debe a que sus electrones en la última capa de valencia tienen spin opuesto, situación que incumple la regla de Hund, lo que desestabiliza la especie de gran manera (Sharpe, 1996). Se obtiene naturalmente de la reacción entre el  $H_2O_2$  y el  $HOCl$  (ecuación 8).



**3.1.1.9. Radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ).** Junto con el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), esta ERO es de las especies químicas más oxidantes presentes en el organismo. Este radical se forma principalmente

de dos maneras: la reacción de Fenton (Fenton, 1894) en la que interactúan iones de  $Fe^{2+}$  con  $H_2O_2$  (Ecuación 9) y la reacción de Haber-Weiss (Haber and Weiss, 1894) en la que interactúan radicales  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  (ecuación 10).



### 3.2. Estrés oxidativo

Puede entenderse como estrés oxidativo a la serie de procesos por los que la célula sufre daño progresivo en proteínas, lípidos e incluso el ADN, causando así un deterioro en las capacidades normales del organismo (Preiser, 2012). Es una afección corporal que se presenta cuando la concentración de radicales libres en el organismo supera la concentración de antioxidantes (Camps, 2010) y por ende, dicho organismo no es capaz de mitigar el daño producido por las reacciones en cadena de los radicales libres.

Entre las causas más comunes del estrés oxidativo se encuentran: malos hábitos alimenticios, fumar, tomar demasiado alcohol, exposición a radiación, contaminación del aire, plaguicidas e incluso la luz solar excesiva (Izquierdo, 2018). En cuanto a las consecuencias, estas dependen de la concentración de radicales libres que se encuentren en el organismo, ya que, si la concentración es solo ligeramente superior a la normal, el estado de homeostasis puede ser recuperado, pero, si la concentración es muy superior a la adecuada, pueden encontrarse consecuencias como: infla-

mación, dolor en huesos y articulaciones, agravamiento de enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer entre otras (Vaquero and de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 2011).

### **3.3. Envejecimiento**

El envejecimiento es un fenómeno cuya definición específica varía dependiendo de la rama de pensamiento del autor. Entre las principales visiones de este fenómeno se encuentran: serie de cambios progresivos, intrínsecos, acumulativos y nocivos que aumentan con el tiempo influyendo al organismo en dimensiones biológicas y, dado el caso, psicológicas y sociales (Cannon, 2015), cambios que aumentan la probabilidad de muerte del organismo, esto, reduciendo las capacidades normales de dicho organismo y posteriormente perdiéndolas (Sullivan et al., 1963) y disminución persistente de los componentes de la aptitud física específicos de la edad debido al deterioro fisiológico interno (Rose et al., 2012). Con todo esto dicho, cabe recalcar que las definiciones de envejecimiento no deben ser consideradas mutuamente excluyentes, sino complementarias, ya que las características descritas en algunas definiciones permiten observar un panorama más global y, por ende, comprender de mejor manera el fenómeno (Tosato et al., 2007).

Algunos autores han formulado la hipótesis de que los radicales libres y las ER contribuyen con el envejecimiento, esto, debido al daño celular acumulado que pueden causar con el tiempo. Esta hipótesis se sustenta en dos hechos principalmente: que en general, los animales con un mayor consumo de oxígeno (del que aproximadamente el 2% se transforma en ERO) son menos longevos (Harman, 1956) y que el daño en el ADN mitocondrial está muy relacionado al envejecimiento y, además, como la fosforilación oxidativa es el proceso que más radicales libres produce en la célula,

es altamente probable que la concentración de radicales libres sea un factor decisivo a la hora de determinar la correlación entre estas especies químicas y el envejecimiento (Miquel et al., 1980).

Debido a lo anterior, también se ha formulado la hipótesis de que los antioxidantes, al prevenir la acción degradante de los radicales libres, son capaces de mitigar y/o prevenir el envejecimiento (Harman, 1956). Aun con ello, deben realizarse muchas más investigaciones centradas en los posibles efectos secundarios, ya que estudios preliminares parecen mostrar efectos prooxidantes tras la administración de cisteína, aumento de la incidencia del cáncer de pulmón tras la administración de betacaroteno y disminución de la respuesta de neutrófilos durante el ejercicio físico tras la administración de vitamina E (Viña et al., 1992).

### **3.4. Triptófano**

El triptófano (TrpH) es uno de los 20 aminoácidos esenciales dentro del cuerpo de los mamíferos, esto quiere decir que el ser humano no puede sintetizarlo, por lo que el único medio de obtención es la ingestión de alimentos ricos en el mismo (Lesniak et al., 2013), entre los que destacan las carnes como el pollo, el pescado y el pavo, así como algunos frutos secos como el maní, la semillas de girasol y de calabaza (Nagai and Taniguchi, 2019).

En términos estructurales, el TrpH es una molécula compuesta por tres grupos destacables, un grupo indol, un grupo carboxilo y un grupo amino (figura 3), los cuales le confieren cierta reactividad. El grupo indol es muy susceptible a ser oxidado debido a la deslocalización de los electrones libres del nitrógeno (Bellmaine et al., 2020), además, tanto el grupo amino como el grupo carboxilo pueden protonarse y deprotonarse según varíe el pH, produciendo así las especies: totalmente protonada, zwitterion y totalmente deprotonada (figura 4). Adicionalmente a esto, de-

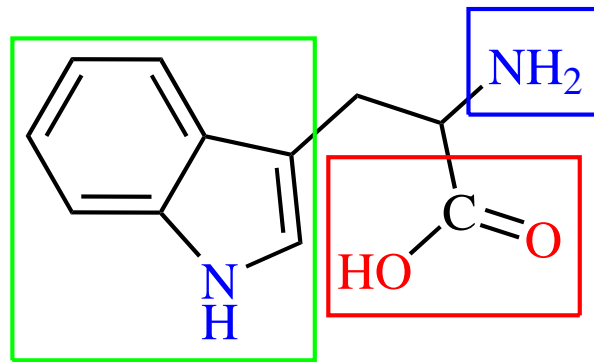


Figura 3. Estructura química del triptófano con sus grupos funcionales indol (verde), amino (azul) y carboxilo (rojo)

vido a la existencia de un carbono quiral en su estructura, el TrpH presenta un par de enantiomeros (L y D), de los cuales, solo el enantiomero L tiene actividad biológica.

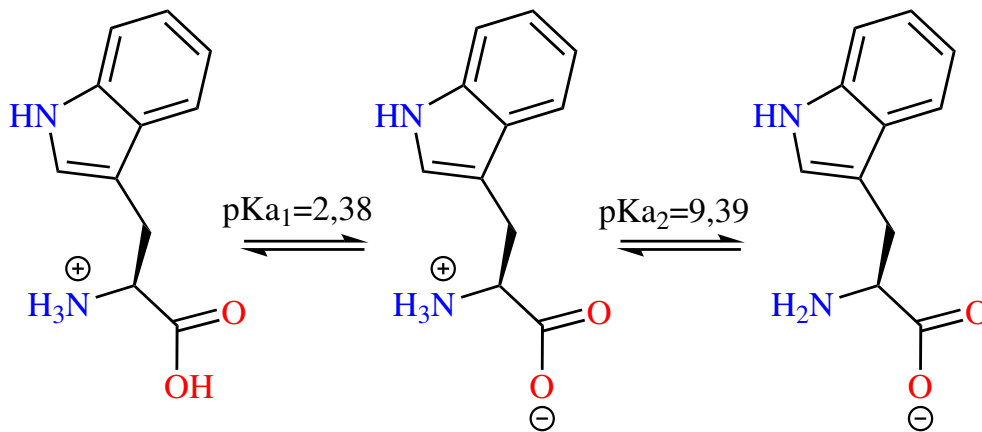


Figura 4. Valores pKa del L-triptófano

**3.4.1. Metabolitos del triptófano.** El triptófano es el precursor de una enorme cantidad de moléculas fundamentales para el óptimo funcionamiento del organismo (Bellmaine et al., 2020). Entre los metabolitos más relevantes (figura 5) se encuentran: el 5-hidroxitriptófano, la 5-hidroxitriptamina, también conocida como serotonina, un neurotransmisor involucrado en el

estado de ánimo, la conducta social y alimentaria, la atención a estímulos, trastornos mentales (depresión y ansiedad principalmente) y en el ritmo circadiano (Berger et al., 2009), la N-acetil-5-metoxitriptamina, también conocida como melatonina, una hormona de vital importancia en el ritmo circadiano, la quinurenina y los ácidos quinurénico, xanturénico y antranílico.

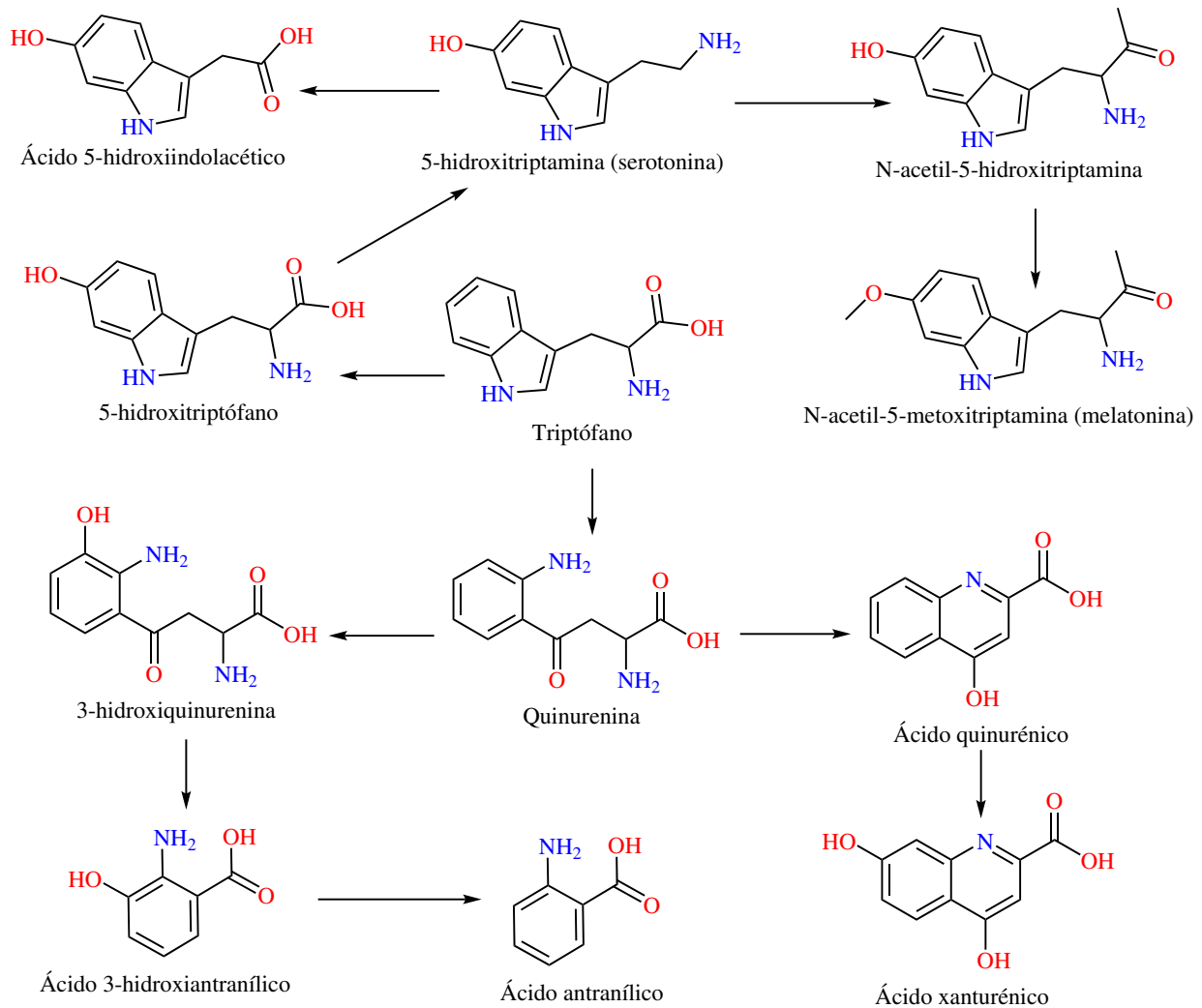


Figura 5. Principales metabolitos del triptófano

**3.4.2. Fotoxidación del triptófano.** Dada la existencia de un grupo indol en el TrpH, este posee una alta densidad electrónica, la cual es muy susceptible a ataques radicalarios que pueden

transformarlo en el cation radical  $TrpH^{\bullet+}$  (Connor et al., 2008), la cual se encuentra en equilibrio con la especie  $Trp^{\bullet}$  (figura 6), radical que suele propagar el daño radicalario (ecuación 12) o, dado el caso, reaccionar con una ERO (figura 7) y seguir metabolizándose normalmente por la vía quinurenina (figura 5).

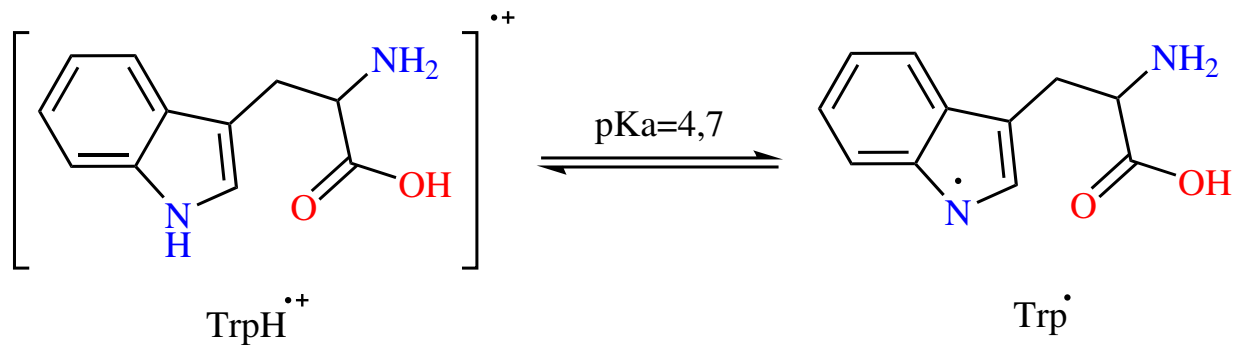


Figura 6. Valor pKa del equilibrio entre los radicales  $TrpH^{\bullet+}$  y  $Trp^{\bullet}$

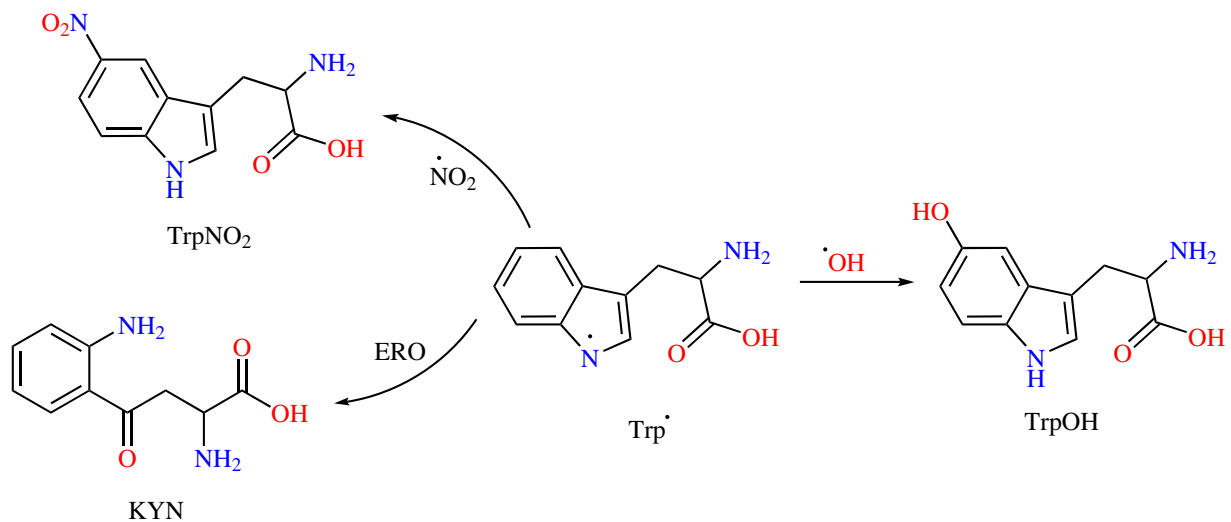


Figura 7. Principales metabolitos del radical  $Trp^{\bullet}$

### 3.5. Fotoxidación

Como su nombre lo indica, es el proceso mediante el cual, fotones con cierta cantidad de energía, inducen la oxidación de un compuesto determinado (Silva et al., 2012). La fotoxidación suele suceder en dos pasos: primeramente, una especie química con pares de electrones libres ( $R$ ) absorbe un fotón ( $h\nu$ ) con energía suficiente para desprender un electrón de su estructura (ecuación 11) y convirtiéndolo en una especie con un electrón desapareado, es decir, un radical libre ( $R^\bullet$ ) y, posteriormente, dada su inestabilidad, el  $R^\bullet$  ataca una molécula determinada ( $M_1$ ) y le abstrae un electrón, estabilizándose, pero transformando a la molécula  $M_1$  en un radical libre (ecuación 12). Adicionalmente, debido a la alta reactividad del radical libre inicial ( $R^\bullet$ ), este puede reaccionar con otras moléculas ( $M_2$ ), las cuales también se transformarían en especies radicalarias, estos radicales  $M_1^\bullet$  y  $M_2^\bullet$ , pueden reaccionar entre sí terminando con la propagación y terminando las reacciones radicalarias (ecuación 13), sin embargo, cabe recalcar que esta reacción de terminación es muy poco probable dada la abundancia de moléculas neutras en proporción a las especies radicalarias.



### 3.6. Antioxidantes

Los antioxidantes (AH) son una familia de compuestos capaces de reducir o eliminar procesos oxidativos en otras moléculas (Halliwell, 1995), esto, reaccionando con los radicales libres que inducen la oxidación, donándoles el o los electrones faltantes (ecuación 14), estabilizando el radical y cortando la propagación radicalaria antes de que ocurra.



Los antioxidantes se clasifican en dos categorías: endógenos y exógenos (Halliwell, 1999). Los antioxidantes endógenos son aquellos que se sintetizan en el organismo y que a su vez se dividen en dos, enzimáticos (como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) y no enzimáticos (como el glutatión y el ácido úrico), por otra parte, los antioxidantes exógenos son aquellos que deben adquirirse mediante la dieta (como la vitamina C, vitamina E y los carotenoides).

### 3.7. Ácido úrico

El ácido úrico (AU) es un ácido débil triprótico normalmente encontrado en el organismo como la especie  $H_2Ur^-$  (figura 8). El AU es el producto del catabolismo de las purinas (figura 1), principalmente de la adenosina y la guanina (Teijón and Garrido, 2006). Este proceso se da en el hígado, riñones e intestino, los cuales son capaces de excretarlo cuando es necesario por medio de la orina, por lo que pertenece a la categoría de molécula de excreción regular, sin embargo, si este proceso no se realiza eficientemente, pueden presentarse concentraciones muy altas de AU en sangre,

condición conocida como hiperuricemia (Kelley, 1993).

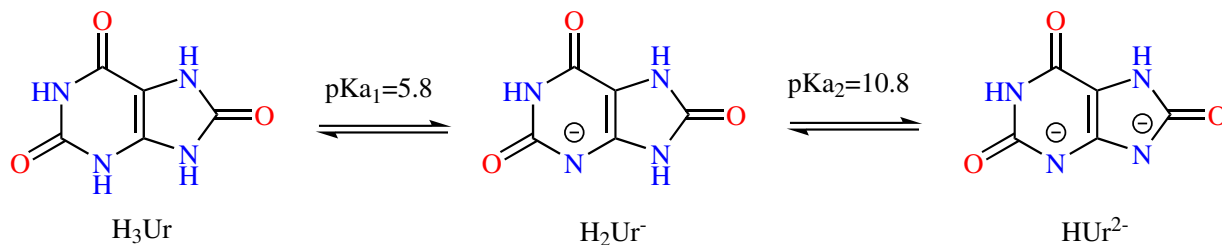


Figura 8. Valores pKa del ácido úrico

No obstante, el AU también es conocido por una especie derivada de su base conjugada, el urato monosódico. El urato monosódico puede viajar vía sanguínea y depositarse en las paredes de una gran cantidad de tejidos, donde pasado el tiempo, suele formar quistes conocidos como cálculos renales si se forman en el riñón o como gota si se forman en las articulaciones (Kelley, 1993).

A pesar de que algunos estudios han evidenciado carácter prooxidante por parte de esta molécula cuando sus condiciones ambientales varían significativamente, ya sea por la adición de algún oxidante, metal de transición o incluso ácido ascórbico (Patterson et al., 2002), el AU es una molécula ampliamente conocida por su acción antioxidante, característica que se detalla en la siguiente sección.

**3.7.1. Caracter antioxidante del ácido úrico.** Durante mucho tiempo, el AU fue solo conocido como el producto del metabolismo de las purinas (figura 1), sin embargo, se ha comprobado que es capaz de neutralizar algunas ERO como el  $^1O_2$  y el  $OH^\bullet$  además de quelar algunos metales de transición e interrumpir la formación del  $ONOO^-$ , todo esto debido a que posee un potencial redox bastante bajo (específicamente de 0.47 a pH = 7) y un radical derivado no tan reactivo (Si-

mic and Jovanovic, 1989), lo que le permite reaccionar con radicales y no propagar el daño por el organismo (Suzuki, 2007).

Junto con el glutatión, el AU es el más importante antioxidante endógeno no enzimático presente en el cuerpo, tanto así, que les suele atribuir cerca del 50 % de la capacidad antioxidante de la sangre en conjunto (Valenzuela, 2016), lo que la hace una molécula de grandísima importancia. Adicionalmente, se ha comprobado que la acción antioxidante del AU depende del medio en el que se encuentre, ya que, en medios hidrofílicos es mayor que en medios hidrofóbicos (Sautin and Johnson, 2008), lo que a su vez explica por qué esta molécula es tan eficiente antioxidativamente en medios acuosos como lo es el plasma sanguíneo.

### **3.8. Mecanismo de reacción**

El estudio de las reacciones químicas es ciertamente complejo, requiere de una gran cantidad de variables y parámetros para dar por concluida la forma específica en la que un reactivo reacciona con otro, esto debido a que dentro de una reacción química pueden existir múltiples pasos, llamados comúnmente procesos elementales. El proceso (sustentado con pruebas experimentales o a veces, computacionales) capaz de describir a nivel molecular el paso a paso de como una reacción química ocurre se conoce como mecanismo de reacción (Enyo, 1973), sin embargo, debe decirse que, a pesar de que un conjunto de datos o simulaciones concuerden con lo predicho por un determinado mecanismo de reacción, esto no es base suficiente para decir que todos los procesos elementales estén descritos de manera correcta, es decir, como ocurren en la naturaleza, lo que convierte al mecanismo de reacción en una suposición a espera de confirmación o ajuste con el paso del tiempo.

Algunos procesos elementales son bastante comunes, entre estos se encuentran: la transfe-

rencia protónica (*proton transfer*, PT), la transferencia electrónica singular (*single electron transfer*, SET), la transferencia formal de hidrógeno (*formal hydrogen transfer*, FHT), la pérdida protónica asistida por solvente (*solvent assisted proton loss*, SAPL), la ganancia protónica asistida por solvente (*solvent assisted proton gain*, SAPG), entre otras

Existen varias formas de determinación de un mecanismo de reacción, entre las que destacan: la adición de especies que confirmen o desmientan la existencia de una especie intermedia determinada, el marcaje isotópico de fragmentos de los reactivos para el monitoreo de la reacción, la visualización de la estereoquímica de reactivos productos de reacción y la cinética química (Swaminathan et al., 1980).

**3.8.1. Posibles mecanismos de reacción entre un radical aminoacídico y un antioxidante.** Dentro de los posibles mecanismos de reacción se encuentran cinco principalmente (Muñoz, 2017): ganancia protónica y transferencia electrónica secuencial (*sequential proton gain-electron transfer*, SPGET), pérdida protónica y transferencia electrónica secuencial (*sequential proton loss-electron transfer*, SPLET), ganancia protónica y transferencia electrónica secuencial (*proton gain-electron sequential transfer*, PEST), transferencia secuencial electrón-protón (*electron-proton sequential transfer*, EPST), transferencia electrónica y protónica acoplada (*proton coupled-electron transfer*, PCET) y transferencia de un átomo de hidrógeno (*hydrogen atom transfer*, HAT).

**3.8.1.1. Transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT).** Este mecanismo de reacción ocurre en tan solo un paso (Dilabio and Johnson, 2007), específicamente, consta de una FHT concertada en la que se transfiere un átomo de hidrogeno desde el antioxidante hasta el radical, obteniendo la especie protonada del radical y la especie radicalaria del antioxidante (ecuación 15).



**3.8.1.2. Transferencia electrónica y protónica acoplada (PCET).** De igual manera que el mecanismo HAT, este mecanismo de reacción ocurre en tan solo un paso (Hammes-Schiffer, 2009). Se lleva a cabo a través de una FHT concertada, pero de manera separada, es decir: se transfieren simultáneamente un protón y un electrón, pero de manera separada. Dichas transferencias se dan del antioxidante al radical, de manera que se obtiene la especie protonada del radical y la especie radicalaria del antioxidante (ecuación 16).



**3.8.1.3. Transferencia secuencial electrón-protón (EPST).** Este mecanismo de reacción se lleva a cabo a través de una FHT secuencial (Kalume et al., 2013), específicamente en 3 pasos: un proceso SET del antioxidante al radical obteniendo un catión radical y un anión (ecuación 17), seguidamente, un equilibrio entre las especies catión radical y anión y un complejo formado entre ellas dos (ecuación 18) finalizando con un proceso PT y la obtención de la especie protonada del radical y la especie radicalaria del antioxidante (ecuación 19).





**3.8.1.4. Transferencia secuencial protón-electrón (PEST).** Este mecanismo de reacción es muy similar al EPST, es decir que también se lleva a cabo mediante una FHT secuencial (Muñoz et al., 2015), por lo que sus procesos elementales son los mismos, pero en un orden distinto, siendo así, primeramente, el equilibrio del complejo (ecuación 20), seguido de la PT (ecuación 21) y finalizando con la SET (ecuación 22).



**3.8.1.5. Perdida protónica y transferencia electrónica secuencial (SPLET).** Este mecanismo es ligeramente más complejo que los anteriores (Urbaniak et al., 2012), esto debido a que: teniendo la especie radicalaria y el antioxidante protonado, por lo que el pH del medio debe tener

un valor menor que el pKa de deprotonación, se da un proceso SAPL sobre el antioxidante obteniendo el anión del antioxidante y permaneciendo igual la especie radicalaria (ecuación 23), dado el caso de que el pH del medio sea mayor del pKa de deprotonación, la primera etapa será omitida. Posterior a ello ocurre una SET, obteniendo el radical del antioxidante y un anión de la especie radicalaria (ecuación 24) y finaliza con un proceso SAPG sobre el anión, obteniendo así la especie protonada y la especie radicalaria del antioxidante (ecuación 25).



**3.8.1.6. Ganancia protónica y transferencia electrónica secuencial (SPGET).** Al igual que el SPLET (Kalume et al., 2013), este mecanismo puede iniciar con un proceso SAPL sobre el antioxidante (ecuación 26) si el pH del medio es menor al pKa de deprotonación, en cuyo caso se obtendría el anión del antioxidante, sin embargo, si el pH del medio es mayor al al pKa de deprotonación, se omitiría este paso, dando lugar a un proceso SAPG sobre el radical, obteniendo el catión radical del radical y el anión del antioxidante (ecuación 27), luego de ello se da la formación de un complejo entre estas especies (ecuación 28), una SET del anión al catión radical (ecuación

29) y el rompimiento del complejo para obtener la especie protonada del radical y la especie radicalaria del antioxidante (ecuación 30).



### 3.9. Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia (HPLC-FLD)

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD), es una técnica de separación de compuestos en la que se tienen en cuenta las interacciones de un analito con la fase móvil y la fase estacionaria (Arce, 2016). Esta técnica basa su detección en la excitación de moléculas presentes en una solución con una longitud de onda específica y la medición de la fluorescencia emitida en una longitud de onda específica distinta a la de excitación

(Fukushima et al., 2022). HPLC-FLD es una técnica mucho más sensible que HPLC-UVVis, tanto así que es incluso comparable con cromatografía de gases acoplada a un detector de masa (GC-MS), con la ventaja de no necesitar costosos gases de arrastre (Cheng et al., 2015).

En cuanto al uso de la técnica con el TrpH y sus metabolitos, es útil el uso de HPLC-FLD en fase reversa, configuración en la que se usa una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar, esto ya que, a pesar de que el TrpH es ciertamente polar, sus metabolitos lo son mucho más, por ello, la separación de los picos es mucho más eficiente (Gehrke, 2005). Cabe recalcar que el uso del detector de fluorescencia permite mantener la especificidad en la detección, esto ya que los picos de absorción y emisión del TrpH son ampliamente conocidos además que de su rendimiento cuántico de emisión es alto, lo cual permite un proceso de absorción-emisión eficiente y, por ende, mayor probabilidad de obtener un cromatograma con alta resolución (Lotte et al., 2004).

## 4. Metodología

Para llevar a cabo los objetivos de este proyecto, fueron necesarios reactivos de grado analítico (sección 4.1), equipos especializados (sección 4.2) y un total de 4 fases metodológicas (sección 4.3), las cuales se enuncian a continuación:

### 4.1. Reactivos

Durante este proyecto se usó L-triptófano de grado analítico marca AppliChem, ácido úrico al 99 % marca Carlo Erba Reagents, buffers formados con ácido cítrico marca J.T.Baker y citrato de sodio tribásico dihidratado marca Carlo Erba Reagents. Además, como solventes se usó agua tipo 1 y acetonitrilo grado HPLC marca Amresco.

### 4.2. Equipos

Durante este proyecto se usó un cromatógrafo de líquidos marca Shimadzu modelo Nexera XS con detector de fluorescencia marca Shimadzu modelo RF-20A, un espectrofotómetro UV-Vis marca Shimadzu modelo Genesys 50, un pH-metro marca Hanna modelo HI2020 edge y una cámara de fotooxidación fabricada por el grupo de investigación LEAM que constó de una nevera de poliestireno de 20 L, un balastro electrónico marca Enerlux modelo 1x28W y una lámpara UV germicida marca Sylvania modelo T8 15W.

### 4.3. Fases metodológicas

**4.3.1. Fase 1: Curvas de calibración.** Con el fin de tener la capacidad de medir la concentración de triptófano en cualquier solución, se pesó la cantidad de TrpH necesario (figura 9a) y se preparó una solución madre (figura 9b) de la cual se diluyeron un total de 5 soluciones (figura 9c)

de concentraciones de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ppm de triptófano por cada pH (figura 9d), una vez listas, se filtraron con filtro de jeringa de 220 pm (figura 9e) y se dispusieron en viales de 1.5 mL para su medición por HPLC-FLD en fase reversa (figura 9f). Una vez obtenidos todos los cromatogramas, se recopilaron en una curva de calibración de área de pico vs concentración. Debe aclararse que la figura 9 se refiere a tan solo 1 de las soluciones preparadas para esta fase metodológica.

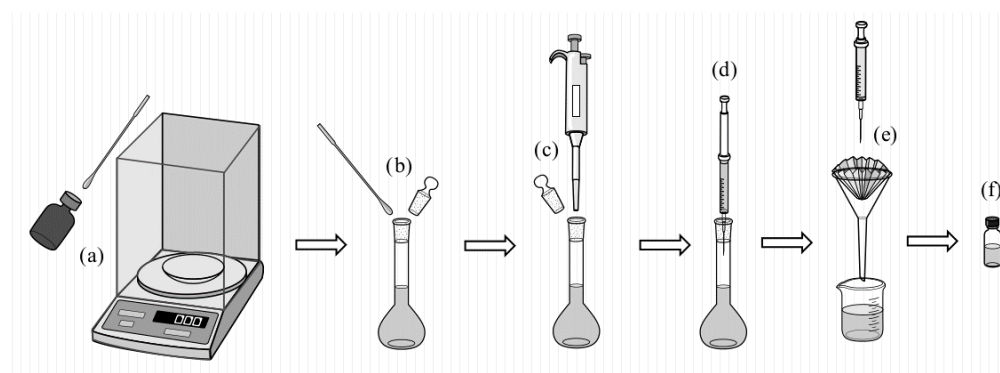


Figura 9. Creación de las curvas de calibración para cada pH

**4.3.2. Fase 2: Oxidación del triptófano.** Para la oxidación de referencia del triptófano, se pesó primeramente la cantidad necesaria de TrpH (figura 10a) para preparar soluciones de triptófano de 10 ppm en buffers correspondientes a cada pH (figura 10b), es decir: 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7. Seguido de ello se realizó un proceso de fotooxidación con una lámpara de mercurio (255 nm) durante 0, 10, 30 y 60 minutos para cada una de las soluciones a pH específico (figura 10c), el cual se realizó colocando 40 mL de cada solución en un vaso de precipitados estándar de 150 mL, agitando con agitador magnético. Cuando el tiempo de fotooxidación correspondiente fue cumplido, cada muestra se filtró con filtro de jeringa de 220 pm (figura 10d) y se dispuso en un vial de 1.5 mL para análisis por HPLC-FLD en fase reversa (figura 10e), el cual se realizó con los siguientes

parámetros: flujo isocrático de H<sub>2</sub>O/ACN 90:10 V/V (1 mL/min), temperatura constante de 25°C, tiempo de duración de la corrida de 10 min, longitudes de onda de excitación y detección 297 y 348 nm respectivamente y finalmente, volumen de inyección de muestra de 10 µL. Debe aclararse que la Figura 10 se refiere a tan solo 1 de las soluciones preparadas para esta fase metodológica.

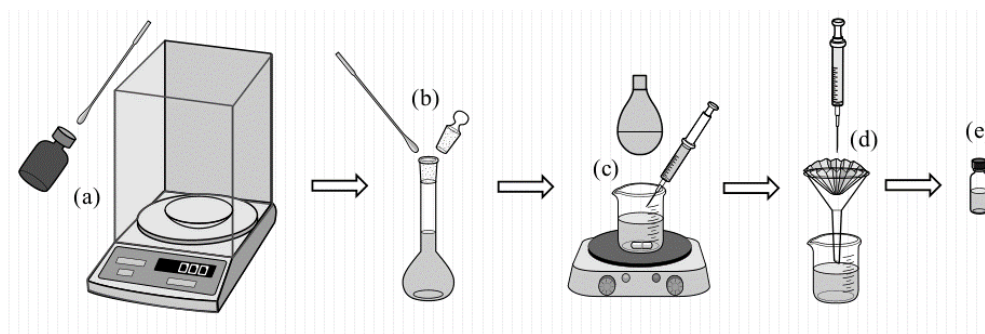


Figura 10. Proceso de fotoxidación del triptófano

**4.3.3. Fase 3: Oxidación del ácido úrico.** Debido a la posibilidad de que el ácido úrico pudiese verse afectado por la radiación de la lámpara UV, es decir, que sea susceptible a fotoxidarse, se pesó la cantidad suficiente de AU (figura 11a) para preparar soluciones de AU de 10 ppm de cada pH (figura 11b), se expusieron a radiación por 0, 10, 30 y 60 minutos, es decir, los mismos tiempos a los que se expuso el TrpH (figura 11c). Estas soluciones se analizaron con espectrofotometría UV-Vis desde 230 hasta 400 nm con lecturas cada 1 nm (figura 11d). Debe aclararse que la Figura 11 se refiere a tan solo 1 de las soluciones preparadas para esta fase metodológica.

**4.3.4. Fase 4: Oxidación de triptófano con ácido úrico.** Para obtener las soluciones respectivas a esta fase, se siguió exactamente el mismo proceso que con las soluciones de TrpH exclusivamente (sección 4.3.2), es decir, se pesó suficiente cantidad de TrpH (figura 12a) para generar soluciones de TrpH 10 ppm a cada pH (figura 12c), además, se pesó AU suficiente (figura

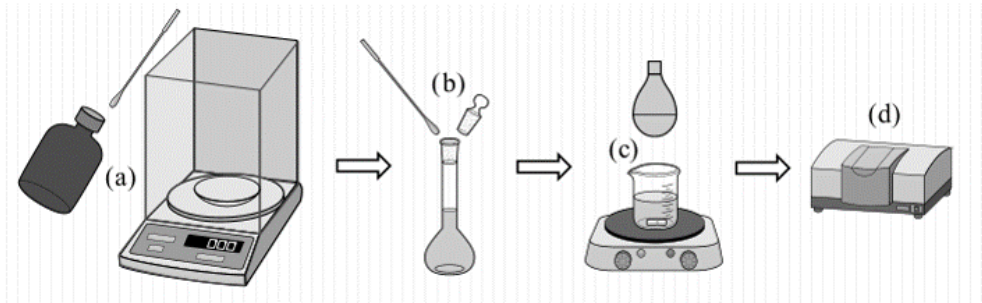


Figura 11. Proceso de fotooxidación del ácido úrico

12b) como para obtener una concentración de 10 ppm (figura 12c) al añadirlo a la misma solución de TrpH. Seguido de esto, se siguió el mismo proceso de fotooxidación, es decir, exposición a radiación UV por 0, 10, 30 y 60 minutos (figura 12d), filtrado de las muestras en filtros de 220 pm (figura 12e) y disposición de las muestras en viales de 1.5mL para el respectivo análisis por HPLC (figura 12f), el cual se realizó exactamente bajo las mismas condiciones que las realizadas en el análisis de la sección 4.3.2. Debe aclararse que la Figura 12 se refiere a tan solo 1 de las soluciones preparadas para esta fase metodológica.

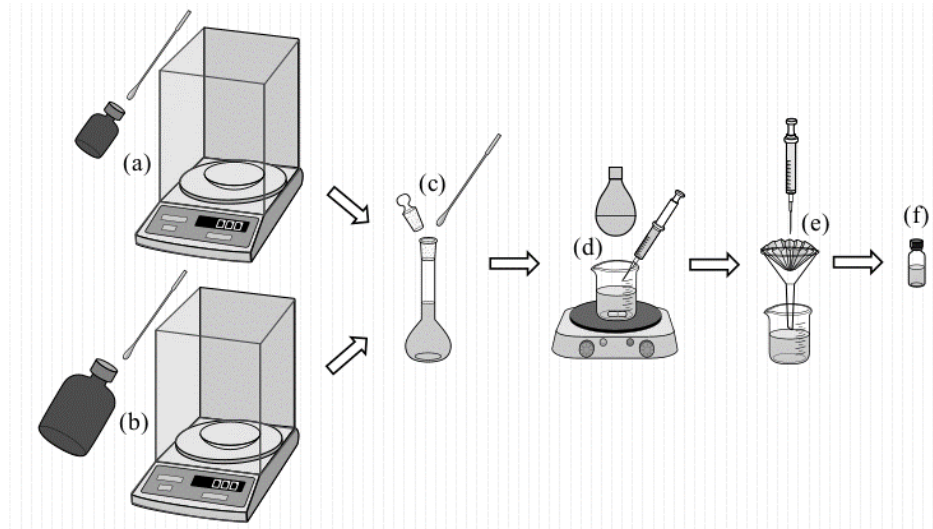


Figura 12. Proceso de fotooxidación del triptófano y ácido úrico

### 5. Análisis de resultados y discusión

Tras la obtención de los cromatogramas propios de la sección 4.3.1 (Anexo 1), se realizaron las respectivas curvas de calibración, las cuales se muestran en las figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19.

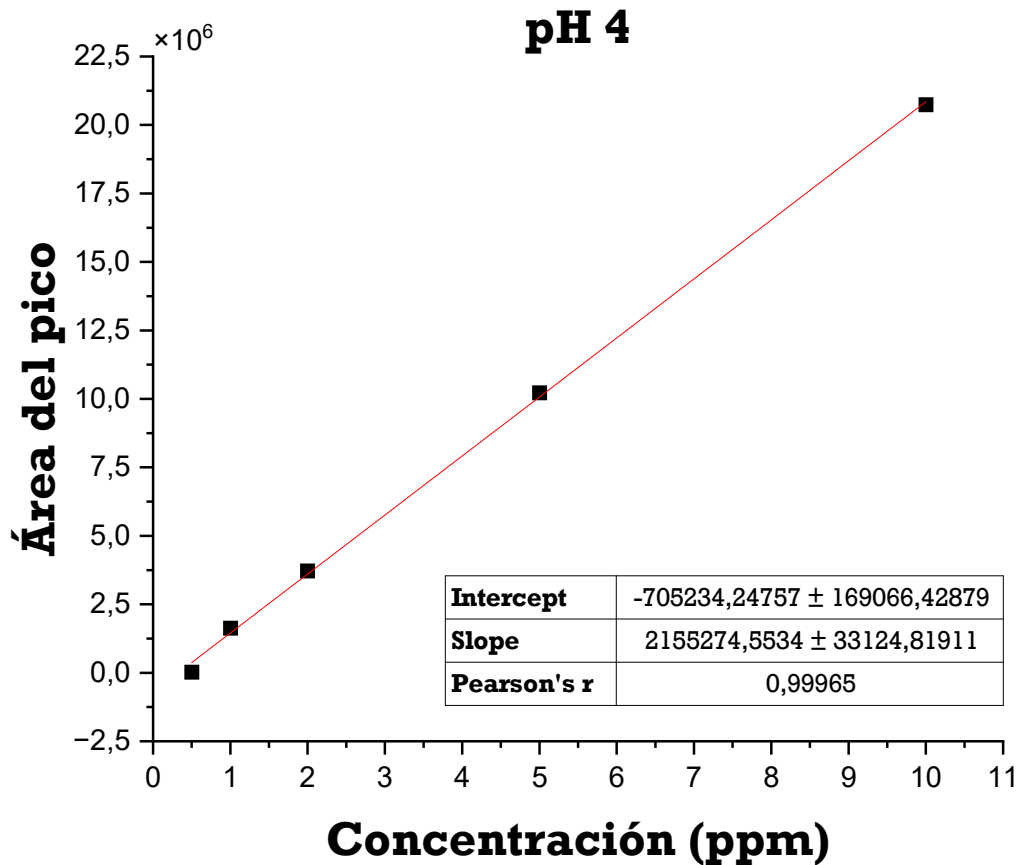


Figura 13. Curva de calibración de TrpH a pH 4

Teniendo en cuenta que el coeficiente de Pearson es superior a 0,99 en cada una de las curvas de calibración, se puede afirmar que todas ellas poseen un grado de correlación muy alto, lo que permite a su vez estimar la concentración de TrpH en cualquier solución analizada por la

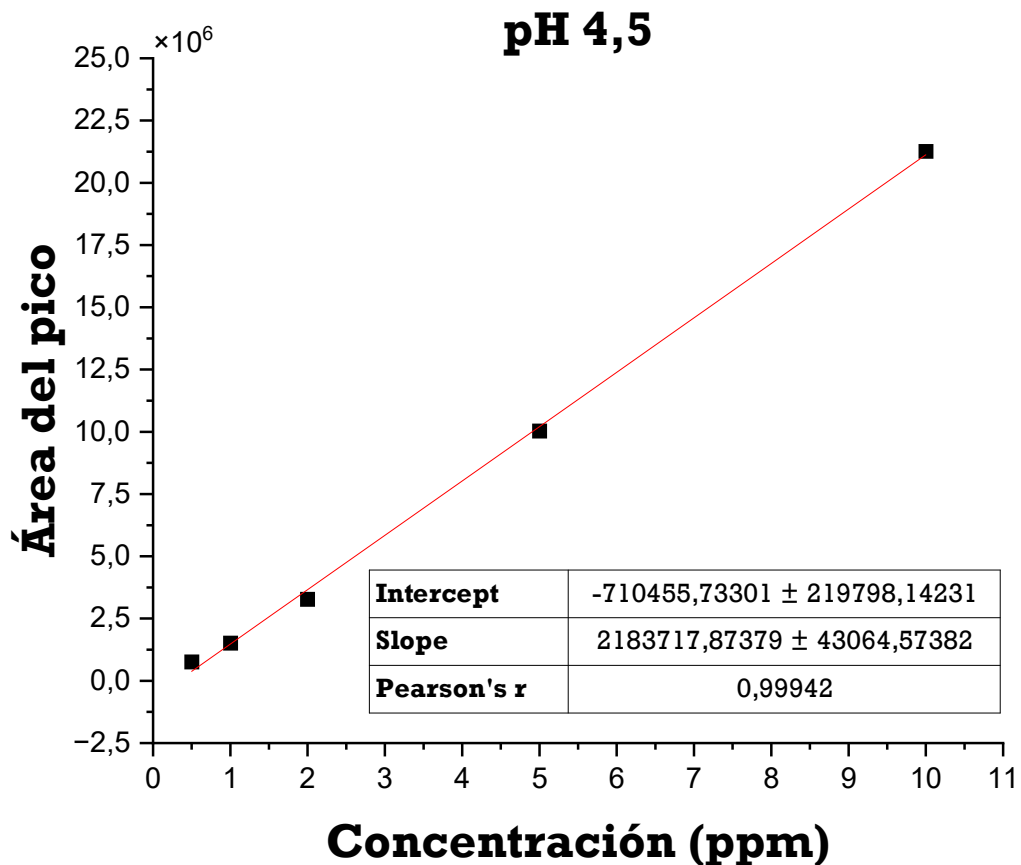


Figura 14. Curva de calibración de TrpH a pH 4,5

misma metodología HPLC-FLD.

Ahora bien, teniendo cada una de las ecuaciones propias de las curvas de calibración a cada pH, y teniendo además los cromatogramas propios de la oxidación de soluciones exclusivamente con TrpH (anexo 2), es decir, las producidas en la sección 4.3.2, es posible ver el comportamiento del TrpH tras la fotooxidación en un tiempo determinado, sin embargo, dada la posibilidad de que las concentraciones iniciales varíen, se operaron los datos para que el primero de ellos, representase la concentración inicial, y el resto de concentraciones variasen en proporción al valor de dicha

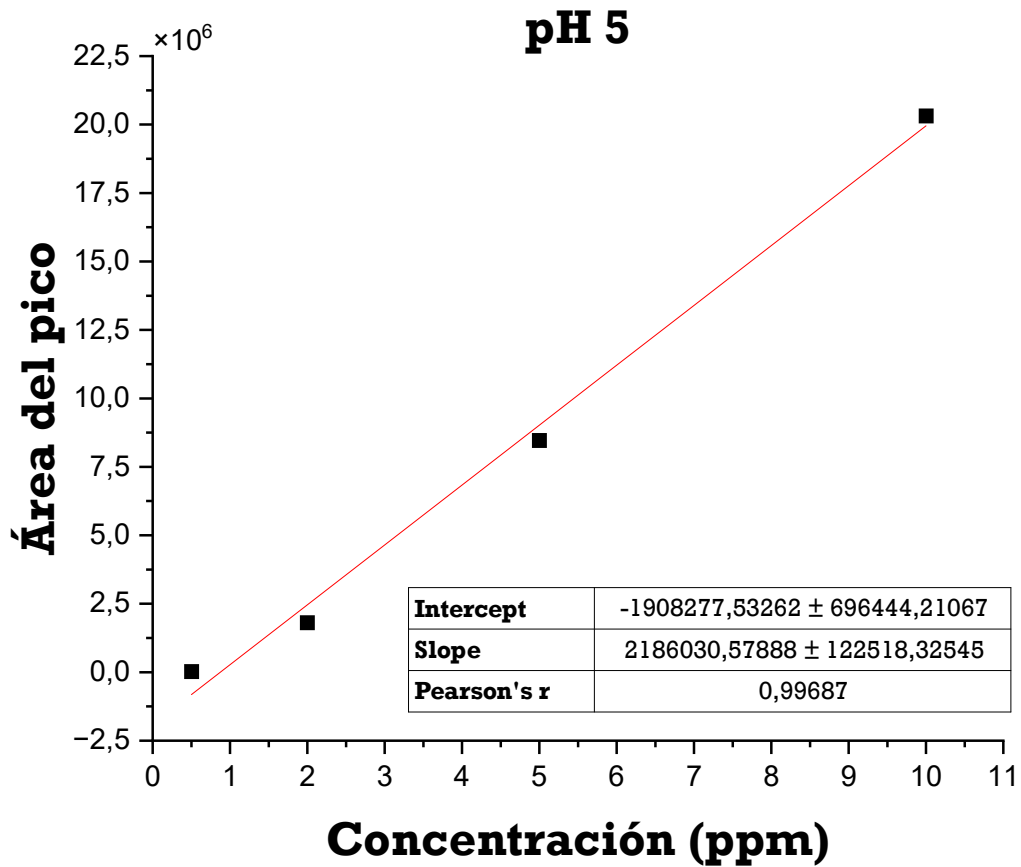


Figura 15. Curva de calibración de TrpH a pH 5

concentración. Este proceso puede entenderse de mejor manera teniendo en cuenta la ecuación 31, donde  $X_n$  es la fracción de TrpH presente en cada medición,  $C_0$  es la concentración inicial en cada pH y  $C_n$  es la concentración de TrpH presente en la solución tras el tiempo determinado de fotooxidación. Cabe recalcar que cuando  $n = 0$ , entonces:  $X_0 = 1$ .

$$X_n = \frac{C_n}{C_0} \quad (31)$$

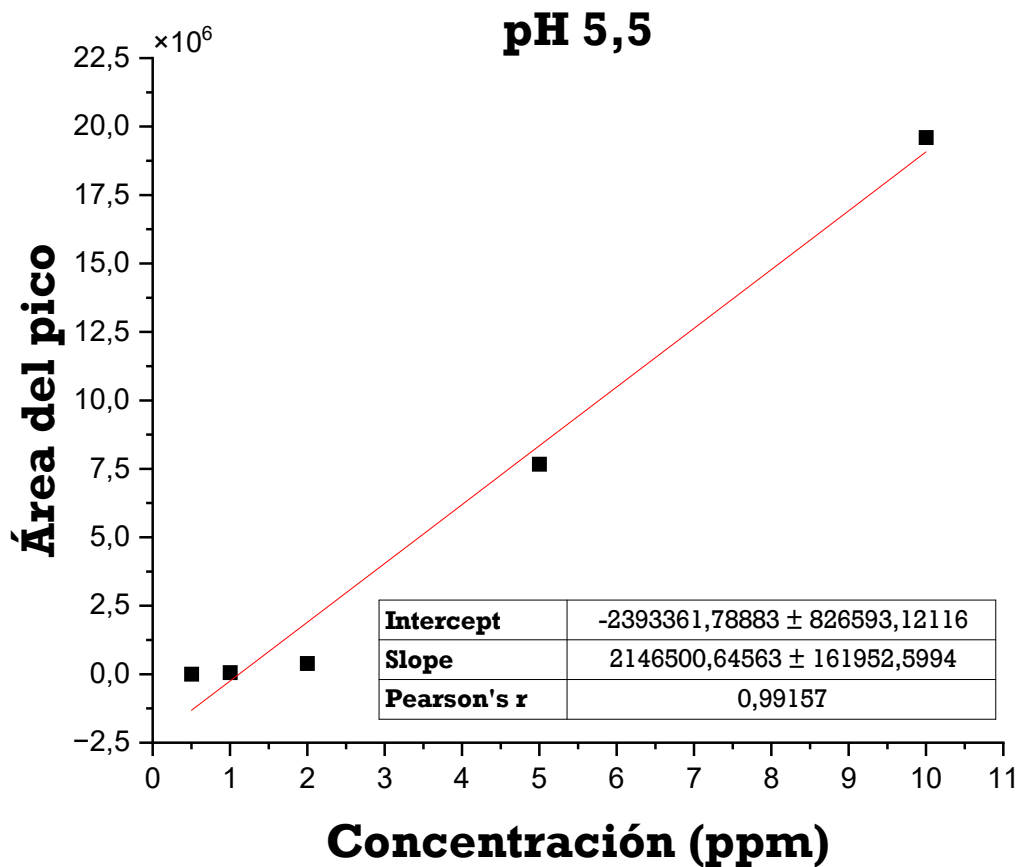


Figura 16. Curva de calibración de TrpH a pH 5,5

Debe añadirse que debido a que la incertidumbre de las mediciones se deriva de la incertidumbre de la curva de calibración propia de cada pH, el cálculo de esta se realizó mediante el corredor de error, además claro de que se sometió al mismo proceso de normalización realizado para obtener las fracciones de TrpH presentes. Esto se resume en la ecuación 32, donde  $\Delta X_n$  es la incertidumbre de la fracción de TrpH en cada medición,  $m$  es la pendiente de la curva de calibración y  $\Delta m$  su incertidumbre,  $b$  el intercepto de la curva de calibración y  $\Delta b$  su incertidumbre,  $C_n$  y  $C_0$  se conservan de la ecuación 31.

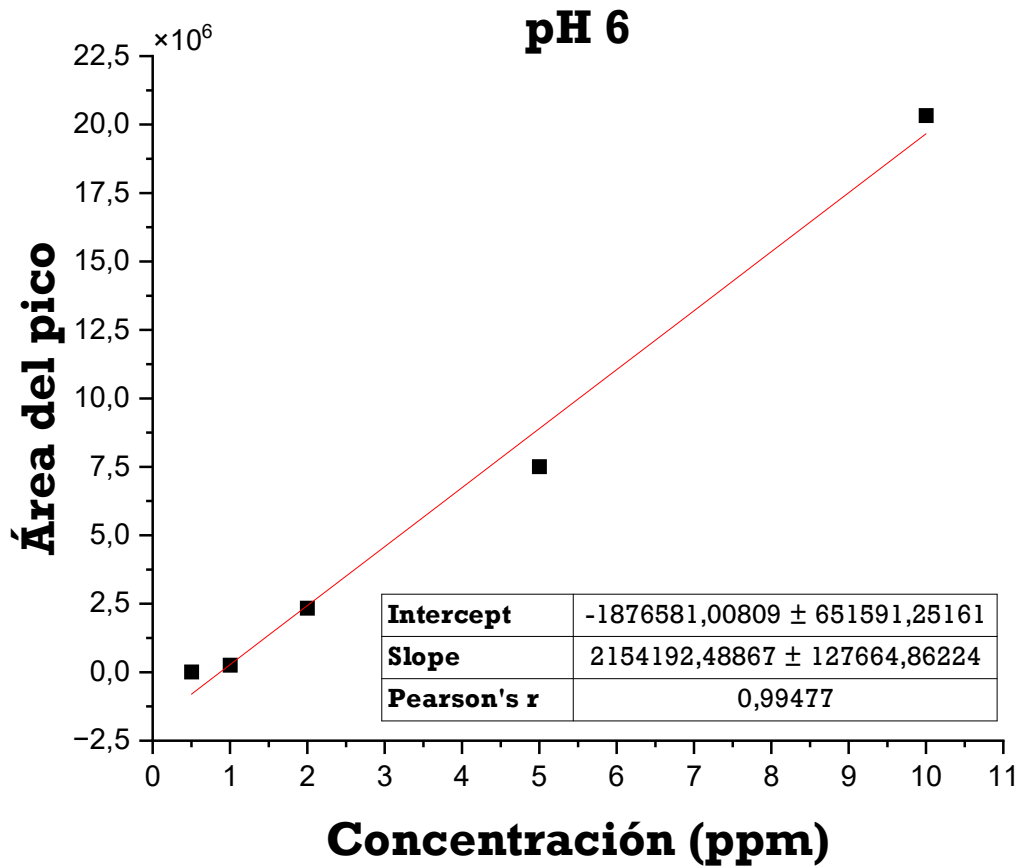


Figura 17. Curva de calibración de TrpH a pH 6

$$\Delta X_n = \frac{C_n}{C_0} \left( \frac{\Delta m}{m} + \frac{\Delta b}{b} \right) \quad (32)$$

Con estos datos se produjo la figura 20, la cual muestra la fracción de TrpH presente en la solución pasado el tiempo determinado en cada medición en una solución donde se encuentra exclusivamente el TrpH.

En la figura 20 puede verse claramente un descenso en la fracción de TrpH residual en

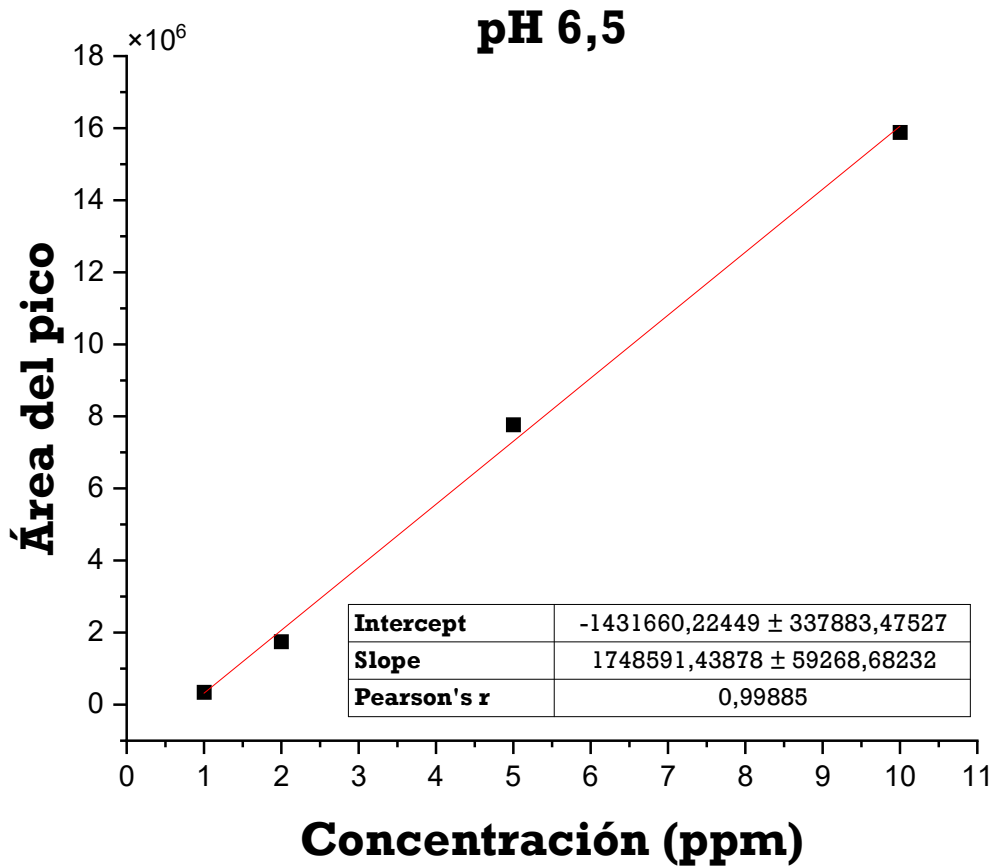


Figura 18. Curva de calibración de TrpH a pH 6,5

cuanto mayor fue el tiempo de exposición a la luz UV de cada solución, por ello, puede inferirse que el fenómeno de fotoxidación es proporcional al tiempo de exposición de cada solución a la luz UV. Además, este fenómeno es poco dependiente del pH y, al menos al tiempo máximo de exposición evaluado (60 min) no muestra una tendencia clara a favor de la fotoxidación en un pH específico.

Ahora bien, antes de realizar la fotoxidación de TrpH en presencia de AU, fue necesario evaluar la susceptibilidad del AU a fotooxidarse, para ello, dada la no fluorescencia del AU, se

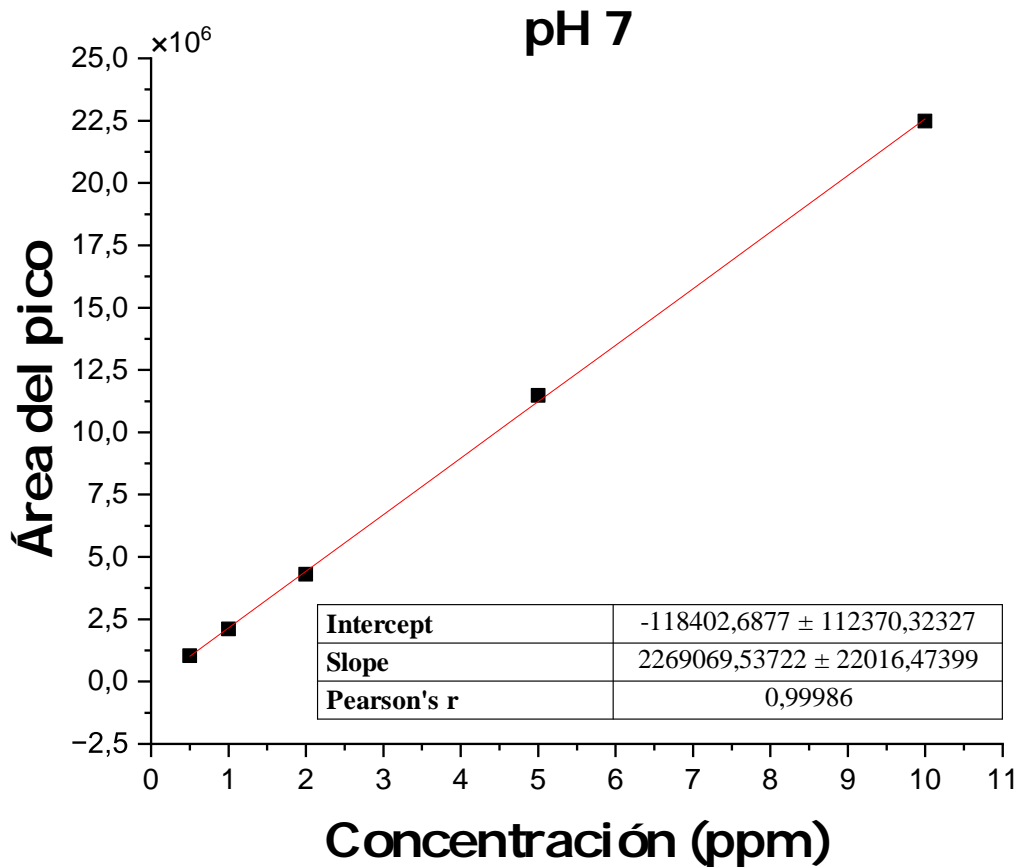


Figura 19. Curva de calibración de TrpH a pH 7

medió su espectro UV-Vis tras la fotoxidación a cada tiempo específico y en cada pH evaluado, lo encontrado se muestra en la figura 21, la cual es el espectro a pH 7, sin embargo, debido a que todos muestran idéntico comportamiento, este es suficiente para exponer los resultados.

Con la figura 21 se pudo inferirse que el AU no es susceptible a fotoxidación con la lámpara usada para este proyecto, esto debido a principalmente dos razones, la primera, que el perfil del espectro es idéntico para cada uno de los tiempos de exposición y la segunda, que la intensidad del pico máximo, es decir, 285 nm, no desciende con el tiempo, por lo que la concentración, al ser

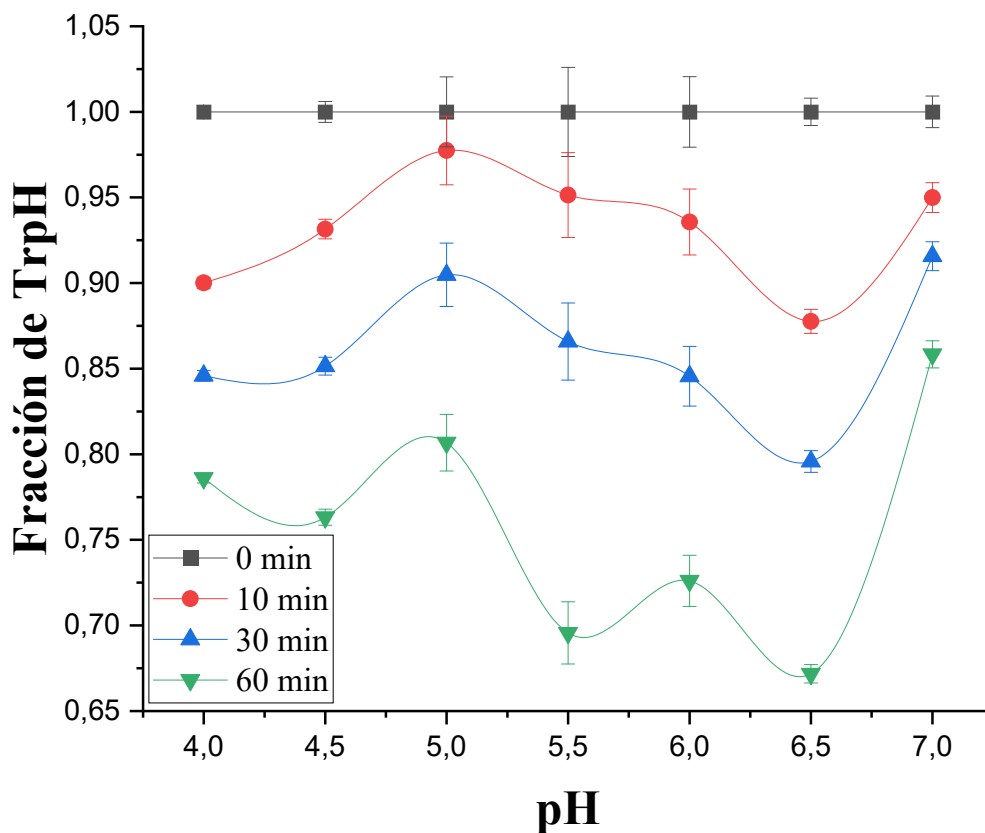


Figura 20. Fracción de TrpH residual ( $X_n$ ) a diferentes valores de pH tras fotooxidación

proporcional a la absorbancia, no se ve mermada.

Debe hacerse la aclaración de que, debido a la ausencia de un láser, la lámpara UV usada no solo genera la longitud de onda necesaria para la fotooxidación de la muestra, sino que también genera otras que calientan la muestra, dando como resultado la evaporación parcial del solvente, lo que a su vez concentra ligeramente la muestra, fenómeno que se refleja en el mínimo aumento de intensidad que posee la figura 21 en su máximo con el paso del tiempo.

Teniendo ahora la seguridad de que el AU no se oxidará tras la exposición con la lámpara

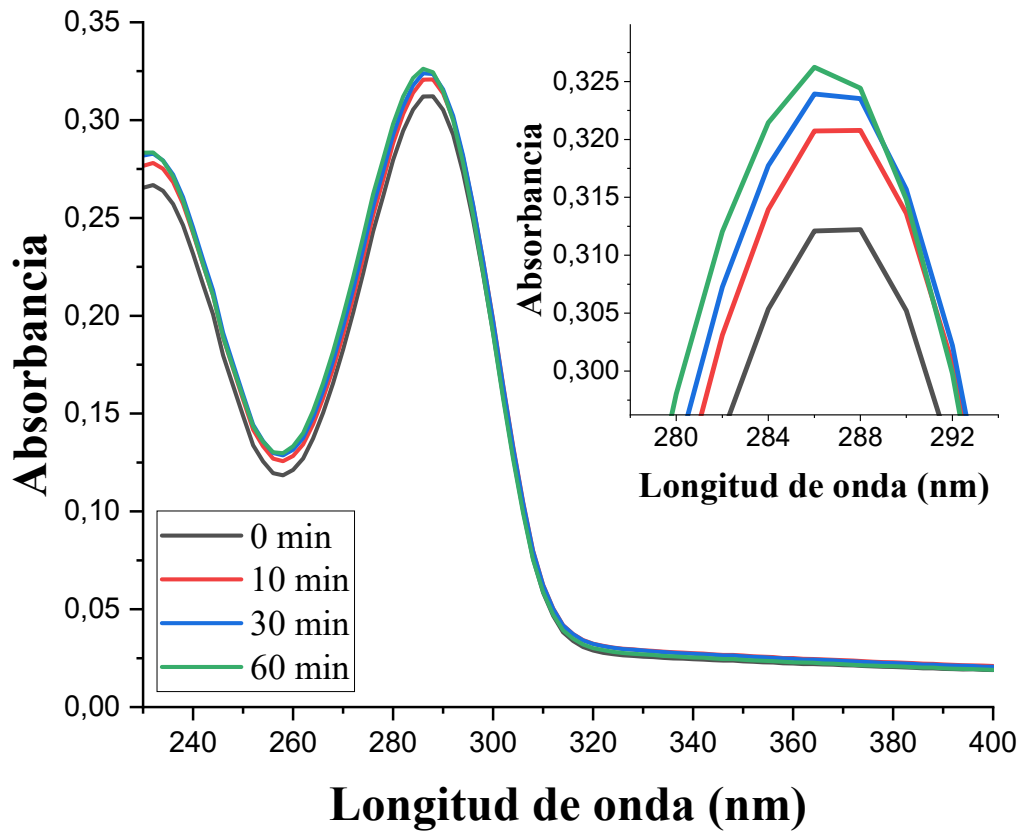


Figura 21. Espectro UV-Vis del AU tras fotooxidación

UV, se realizó el proceso expuesto en la sección 4.3.4, obteniendo de esa manera la figura 22.

De igual manera que en la figura 20, en la figura 22 se observa un descenso en la fracción de TrpH residual en cuanto mayor fue el tiempo de exposición a la luz UV de cada solución, sin embargo, en este caso, si se observa una tendencia que favorece la conservación de TrpH en pHs ácidos, específicamente, aquellos inferiores a 5.5. Gracias a esto, es posible inferir que la antioxidación del TrpH por parte del AU es más eficiente cuando el pH es inferior a 5.5, lo que corresponde a su vez al equilibrio entre las especies  $H_3Ur$  y  $H_2Ur^-$  ( $pK_a = 5.8$ ) y el equilibrio

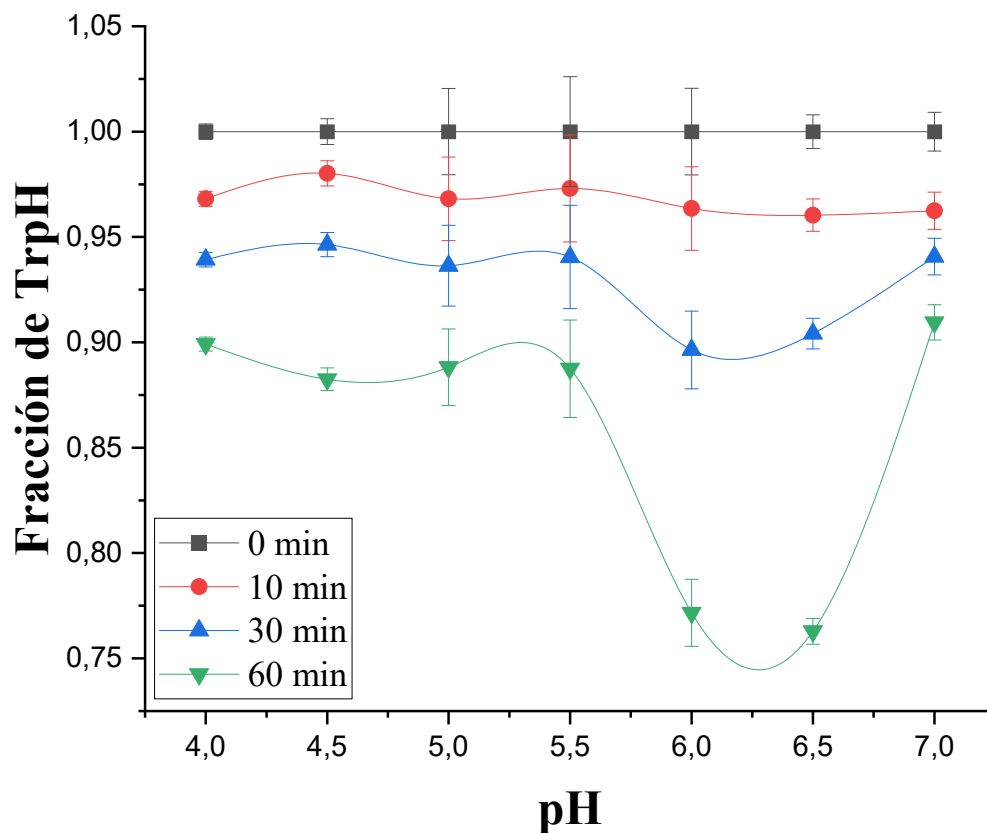


Figura 22. Fracción de TrpH residual ( $X_n$ ) a diferentes valores de pH tras fotooxidación en presencia de AU

entre los radicales  $TrpH^{\bullet+}$  y  $Trp^{\bullet}$  ( $pK_a = 4.7$ ). Esta situación permite realizar la comparación entre el comportamiento de la antioxidación ante cada situación específica, es decir, cada uno de los radicales frente a cada una de las fracciones del antioxidante.

Primeramente, deben delimitarse los rangos de pH en los que cada una de las especies existe, para esto se recurrirá a la figura 23 y a la tabla 2 en las que dicha existencia en conjunto se ve claramente. Una vez hecho esto, y comparando dicha información con las fracciones residuales de

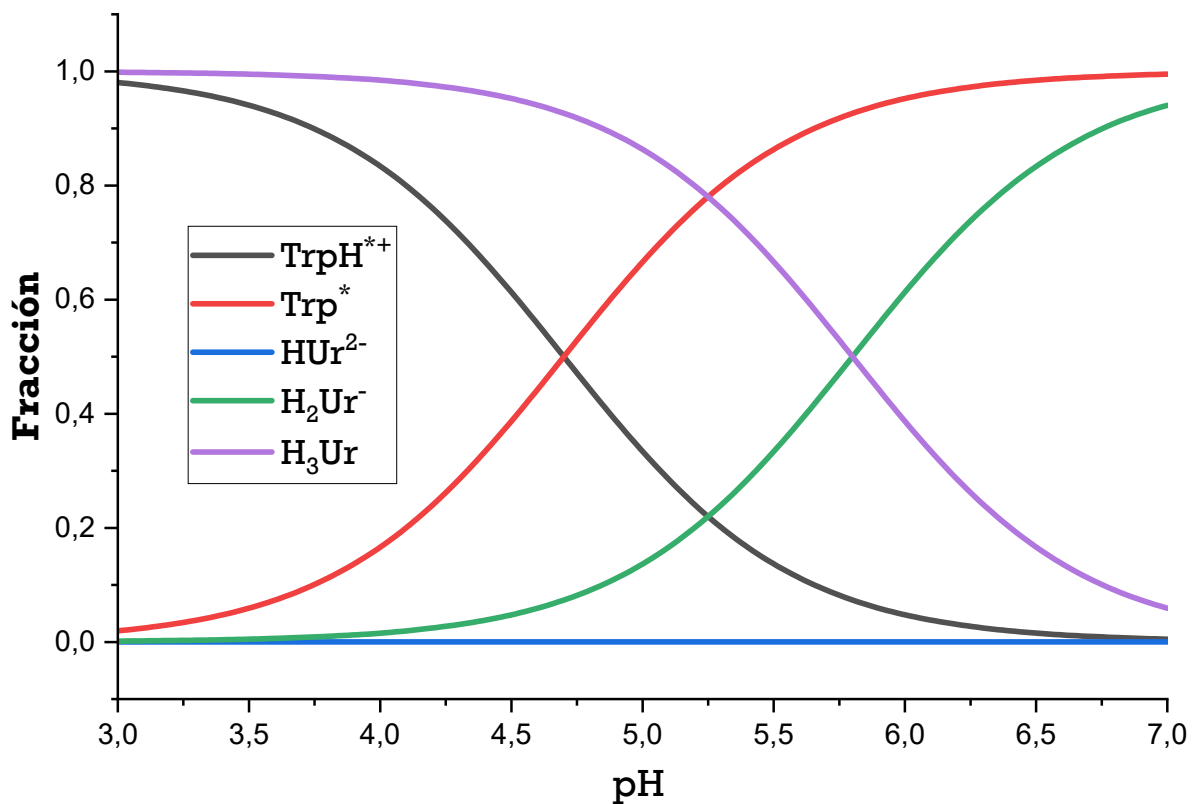


Figura 23. Fracciones de ácido úrico y radicales de triptófano presentes en el medio a diferentes valores de pH

TrpH en cada pH (figura 22), puede argumentarse que existe una alta capacidad de neutralización por parte de la fracción  $H_3Ur$  frente a ambos radicales de triptófano, de hecho, la fracción residual de TrpH ( $X_n$ ) es muy similar en ambos casos, sin embargo, el proceso de antioxidación a partir de pH = 6 es mucho menos eficiente, en parte, debido a la baja capacidad antioxidante de la fracción  $H_2Ur^-$ , y en parte, por la baja afinidad electrónica del radical  $Trp^*$ , hecho que se evidencia a través de un claro descenso en la fracción residual de TrpH ( $X_n$ ) a partir del mencionado pH = 6.

pH	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
<b>Especie radicalaria</b>	$TrpH^{\bullet+}$	$TrpH^{\bullet+}$	$Trp^{\bullet}$	$Trp^{\bullet}$	$Trp^{\bullet}$	$Trp^{\bullet}$	$Trp^{\bullet}$
<b>Fracción antioxidante</b>	$H_3Ur$	$H_3Ur$	$H_3Ur$	$H_3Ur$	$H_2Ur^-$	$H_2Ur^-$	$H_2Ur^-$

Tabla 2

*Especies radicalarias y fracciones antioxidantes presentes en cada pH*

pH	Solución con TrpH	Solución con TrpH y AU	Porcentaje de inhibición (%)
4	0,786±0,00289	0,899±0,00331	47,2
4.5	0,763±0,00465	0,882±0,00538	49,8
5	0,80±0,01650	0,88±0,01816	60
5.5	0,69±0,01812	0,88±0,02312	38,7
6	0,72±0,01493	0,77±0,01587	82,1
6.5	0,671±0,00537	0,762±0,00610	72,3
7	0,858±0,00790	0,909±0,00837	64,1

Tabla 3

*Valores de  $X_n$  tras la fotoxidación (por 60 min) del TrpH solo y en presencia de AU*

Ahora bien, comparando las figuras 20 y 22 puede inferirse que sin importar que en la solución expuesta a luz UV se introduzca un antioxidante, el TrpH se verá fotoxidado en alguna fracción determinada, sin embargo, este fenómeno si puede verse mermado. Esto se evidencia mucho más claramente en la tabla 3, la cual muestra que la fracción residual de TrpH en un tiempo de exposición de 60 min (el máximo evaluado y, por ende, el más representativo) cuando este se encuentra en presencia de AU. Aun con todo, debe observarse que la variación en las fracciones de TrpH cuando se encuentra solo y en presencia de AU, solo se evidencia tras un tiempo de fotoxidación superior a los 30 min, hecho que se evidencia claramente en la incertidumbre vista gráficamente en la figura 22 y cuantitativamente en la tabla 3.

Habiendo ya analizado los datos de manera cualitativa, se procedió a estimar la constante de velocidad de la reacción, constante propia de una ecuación de segundo orden tal como lo establecen Acosta (2015) y Muñoz (2017), para esto, primeramente, debe recurrirse a la ecuación 33 en la que  $[TrpH^\bullet]$  y  $[TrpH^\bullet]_0$  son las concentraciones radicalarias de triptófano en un momento puntual e inicial respectivamente. Seguido de ello, dado el hecho de que una concentración radicalaria es muy difícil de determinar experimentalmente, se recurrió a la ecuación 34, donde  $\alpha$  es el coeficiente de conversión de triptófano en especies radicalarias de triptófano,  $[TrpH]$  es la concentración de triptófano y  $[TrpH^\bullet]$  es la concentración radicalaria del triptófano, cabe aclarar que  $TrpH^\bullet$  puede representar tanto a la especie  $TrpH^{\bullet+}$  como a la especie  $Trp^\bullet$ .

$$k = \frac{\frac{1}{[TrpH^\bullet]} - \frac{1}{[TrpH^\bullet]_0}}{t} \quad (33)$$

$$[TrpH^\bullet] = \alpha[TrpH] \quad (34)$$

Fusionando las ecuaciones 33 y 34 se puede obtener la ecuación 35 en la que  $[TrpH]$  y  $[TrpH]_0$  son las concentraciones de triptófano en un momento puntual e inicial respectivamente,  $t$  es el tiempo y  $k$  es la constante de velocidad. Una vez despejada la ecuación 33 en favor de  $\alpha$ , se obtiene como resultado la ecuación 36.

$$k = \frac{\frac{1}{\alpha[TrpH]} - \frac{1}{\alpha[TrpH]_0}}{t} \quad (35)$$

pH	k de Acosta (2015)	k de Muñoz (2017)	Valor promedio de k ( $M^{-1}s^{-1}$ )
4	$3,68 \times 10^7$	$2,48 \times 10^7$	$3,1((\pm 0,60) \times 10^7$
4.5	$3,02 \times 10^7$	$2,03 \times 10^7$	$2,5(\pm 0,49) \times 10^7$
5	$3,55 \times 10^7$	$2,39 \times 10^7$	$3,0(\pm 0,58) \times 10^7$
5.5	$3,21 \times 10^7$	$2,16 \times 10^7$	$2,7(\pm 0,52) \times 10^7$
6	$5,94 \times 10^7$	$3,99 \times 10^7$	$5,0(\pm 0,97) \times 10^7$
6.5	$5,10 \times 10^7$	$3,43 \times 10^7$	$4,3(\pm 0,83) \times 10^7$
7	$3,00 \times 10^7$	$2,02 \times 10^7$	$2,5(\pm 0,49) \times 10^7$

Tabla 4  
Valores de  $k$  a diferentes pHs

$$\alpha = \frac{[TrpH]_0 - [TrpH]}{[TrpH]_0 \cdot [TrpH] \cdot k \cdot t} \quad (36)$$

Ahora bien, para estimar el valor de  $\alpha$  debe considerarse el valor de  $k$  en algún punto conocido, el cual es el pH = 7, el cual fue reportado como  $2,02 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  por Muñoz (2017) y como  $3 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  por Acosta (2015), por lo que, aplicando la ecuación 36, y con ella, realizando el cálculo de cada uno de los valores de  $\alpha$  de  $2,786 \times 10^{-8}$  para el caso de Acosta (2015) y  $4,138 \times 10^{-8}$  para el caso de Muñoz (2017).

Una vez obtenidos los valores de  $\alpha$ , se usaron para encontrar los valores de las constantes de velocidad derivadas de cada  $\alpha$  a cada pH, para esto se usó la ecuación 35. Cuando se obtuvieron los valores de  $k$  por medio de ambos  $\alpha$ , se promediaron y se recopilaron en la tabla 4. Cabe aclarar que a pesar de nombrarse como “k de Acosta” y “k de Muñoz”, esta expresión refiere a los valores de  $k$  obtenidos mediante la constante  $\alpha$  proveniente de Acosta (2015) y de Muñoz (2017).

Dentro de las apreciaciones del trabajo de Muñoz (2017) se encuentra la atribución de una

mayor probabilidad de ocurrencia a los mecanismos PEST y SPGET, los cuales describen el perfil que se muestra en el anexo 4, en la cual se puede apreciar perfectamente que los mecanismo PEST y SPGET poseen valores de  $k$  en el orden de  $10^8$  y  $10^7$  respectivamente, por lo que, dado el hecho de que los valores de  $k$  obtenidos en la tabla 4 son del orden de  $10^7$  es probable que el mecanismo de reacción correspondiente a la antioxidación del triptófano por parte del ácido úrico sea el SPGET, por lo que la reacción de antioxidación puede ser descrita por medio de la ecuación 37, teniendo en cuenta que  $TrpH^\bullet$  puede representar tanto la especie  $TrpH^{\bullet+}$  como la especie  $Trp^\bullet$ , así como  $AU$  puede representar tanto la especie  $H_3Ur$  como la especie  $H_2Ur^-$  dependiendo del pH del medio.



## 6. Conclusiones

Se encontró que la metodología dispuesta para la medición de la concentración de triptófano en cualquier solución es confiable y efectiva, lo que se aprecia respectivamente en el hecho de que el coeficiente de correlación de cada una de las curvas de calibración obtenidas es superior a 0.99 y en la capacidad de calcular la concentración de triptófano en el resto de soluciones de este trabajo de grado.

Se demostró que el triptófano es susceptible a procesos de fotoxidación, hecho que se demuestra a través del descenso en la concentración de las soluciones de triptófano con mayor tiempo de irradiación con luz UV de 255 nm con respecto a aquellas soluciones idénticas, pero con menor tiempo de irradiación con luz UV de 255 nm.

Se observó que el ácido úrico no redujo su concentración en aquellas soluciones irradiadas con fotones UV de 255 nm, lo que puede ser interpretado como nula susceptibilidad a la fotoxidación en las condiciones específicas en las que la metodología fue ejecutada.

Se corroboró la existencia de la acción antioxidante del ácido úrico sobre el triptófano, esto mediante la comparación de la fracción de triptófano residual ( $X_n$ ) en soluciones fotoxidadas con solo triptófano y con triptófano y ácido úrico, valores que, sin importar el pH, siempre permanecieron inferiores en las primeras soluciones con respecto a las segundas. Sin embargo, esto no significa que el ácido úrico sea capaz de inhibir completamente la fotoxidación del triptófano, sino que es capaz de reducir el ritmo al que esta ocurre.

Se evidenció una mayor prevención de la fotoxidación en pHs inferiores a 5.5. Entre los

posibles motivos por lo que este fenómeno ocurre destacan dos: la acción antioxidante más o menos eficiente de las diferentes fracciones de ácido úrico y el equilibrio entre los diferentes radicales de triptófano, ambos motivos mediados por el pH del medio.

Se estimó la constante de velocidad de la reacción de antioxidación en cada pH estudiado obteniendo valores del orden de  $10^7$ , con esta información se presume que el mecanismo de reacción más probable es el SPGET.

## **7. Recomendaciones**

Al momento de ejecutar la metodología, debe tenerse especial precaución en la preparación de las soluciones (pesado del reactivo, disolución total y aforado) y en el proceso de fotoxidación (agitar para lograr la homogeneización de la solución, área de irradiación y volumen de solución irradiada constantes), además, debe procurarse guardar las soluciones en frascos de ámbar y realizar los análisis tanto de HPLC como de espectrofotometría UV-Vis lo antes posible tras realizar el proceso de fotoxidación.

## **8. Trabajo futuro**

Actividades complementarias a los desarrollos presentados incluyen la evaluación del carácter antioxidante en función del pH de diferentes antioxidantes entre los que se destacan el ácido ascórbico, el glutatión y el trolox sobre diferentes aminoácidos entre los que destacan la tirosina y la leucina, esto debido a que existen estudios computacionales (Muñoz, 2017) que describen los mecanismos de reparación de los radicales aminoacídicos en espera de su prueba o refutación experimental.

Además de esto, sería oportuno realizar el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los diferentes productos de fotoxidación del triptófano, es decir, los vistos en este texto y quizá incluso compararlos con los productos de oxidación provenientes de la antioxidación con otras moléculas antioxidantes.

### Referencias Bibliográficas

- Acosta, S. (2015). Desarrollo de método para detección de productos electrofílicos de la oxidación de tirosina.
- Albrich, J., McCarthy, C., and Hurst, J. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *National Library of Medicine*.
- Alcaíno, H., Greig, D., Castro, P., Verdejo, H., Mellado, R., García, L., Díaz-Araya, G., Quiroga, C., Chiong, M., and Lavandero, S. (2011). The role of uric acid in heart failure. *Revista médica de Chile*.
- Andreoli, T. (2011). Free radicals and oxidative stress. *Department of Internal Medicine, University of Arkansas College of Medicine*.
- Arce, M. (2016). Determinación, mediante cromatografía de líquidos con detección fluorescente, de bisfenol a fenol migrado desde juguetes y envases de suero. *Universidad de Burgos*.
- Bellmaine, S., Schnellbaecher, A., and Zimmer, A. (2020). Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Berger, M., Gray, J., and Roth, B. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*.
- Camps, D. (2010). *Bioquímica del estrés Oxidativo*. Lulu Enterprises Incorporated.

Cannon, M. (2015). What is aging? *Disease-a-month*.

Carbonero, P. (1976). *Metabolismo de aminoácidos*.

Cheng, W., Wang, X., Liu, B., and Liu, G. (2015). Comparison of hplc-fld with gc-ms in estimation of benzo[a]pyrene in sesame oil. *Food Storage and Preservation*.

Companiononi, M. (1995). *Acido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio*.

Connor, H., Sturgeon, B., Mottley, C., Sipe, H., and Mason, R. (2008). 1-tryptophan radical cation electron spin resonance studies: Connecting solution-derived hyperfine coupling constants with protein spectral interpretations. *American Chemical Society*.

Corrales, L. and Muñoz, M. (2012). *Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno*.

Davies, M. J. (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

De Grey, A. (2002).  $\text{HO}_2^*$ : the forgotten radical. *National library of Medicine*.

Dilabio, G. and Johnson, E. (2007). Lone pair-pi and pi-pi interactions play an important role in proton-coupled electron transfer reactions. *National library of medicine*.

Enyo, M. (1973). Reaction mechanisms. *NAtional Library of Medicine*.

Fenton, H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*.

- Finkel, T. and Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*.
- Fukushima, T., Umino, M., Sakamoto, T., and Onozato, M. (2022). A review of chromatographic methods for bioactive tryptophan metabolites, kynurenine, kynurenic acid, quinolinic acid, and others, in biological fluids. *Biomedical Chromatography*.
- Gehrke, C. (2005). 1.1.2. - quantitation of amino acids by gas-liquid chromatography. In *Quantitation of amino acids and amines by chromatography*. Elsevier.
- Haber, F. and Weiss, J. (1894). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *The Royal Society*.
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*.
- Halliwell, B. (1999). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *National Library of Medicine*.
- Hammes-Schiffer, S. (2009). Theory of proton-coupled electron transfer in energy conversion processes. *American Chemical Society*.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*.
- Izquierdo, A. (2018). *Estrés oxidativo y antioxidantes en animales*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

- Kalume, A., George, L., Cunningham, N., and Reid, S. (2013). Case of the missing isomer: pathways for molecular elimination in the photoinduced decomposition of 1,1-dibromoethane. *National library of medicine*.
- Kelley, W. (1993). *Medicina interna*. Médica Panamericana.
- Lesniak, W., Jyoti, A., Mishra, M., Louissaint, N., Romero, R., Chugani, D., Kannan, S., and Kannan, R. (2013). Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. *Analytical Biochemistry*.
- Lotte, K., Plessow, R., and Brockhinke, A. (2004). Static and time-resolved fluorescence investigations of tryptophan analogues - a solvent study. *Photochemical photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*.
- Macedo-Márquez, A. (2012). *La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de Saccharomyces cerevisiae*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.
- Marotte, C. and Zeni, S. (2013). *Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas*.
- Mata, P., Solís, M., Sánchez, M., García, R., and Arias, S. (2010). *El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes*.
- Miquel, J., Economos, A., Fleming, J., and Johnson, J. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Experimental gerontology*.

Muñoz, L. (2017). *Estudio teórico de la reparación del daño causado por radicales libres de modelos proteicos y lipídicos y sus mecanismos de acción*. PhD thesis, Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM).

Muñoz, L., George, L., and Alvarez-Idaboy, J. (2015). Proton-electron sequential transfers mechanism: A theoretical evidence about its biological relevance. *Physical Chemistry Chemical Physics*.

Nagai, R. and Taniguchi, N. (2019). *Amino acids and proteins*. Medical Biochemistry.

Patterson, R., Horsley, E., and Leake, D. (2002). Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward ldl. *Journal of Lipid Research*.

Pomilio, A., Ciprian, J., and Vitale, A. (2013). *Flavoproteínas que actúan como amino-oxidasas: Estructura, función e importancia clínica*.

Preiser, J. (2012). How to characterize an antioxidant: an update. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*.

Prütz, W. (1996). Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, dna, and other biological substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Rifkind, J., Nagababu, E., Ramasamy, S., and Babu, L. (2003). Hemoglobin redox reactions and oxidative stress. *National library of Medicine*.

- Robinson, K. and Beckman, J. (2005). Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide. *National Library of Medicine*.
- Rose, M., Flatt, T., Graves, J., Greer, L., Martinez, D., Matos, M., Mueller, L., Shmookler, R., and Shahrestani, P. (2012). What is aging? *Frontiers in genetics*.
- Sautin, Y. and Johnson, R. (2008). Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*.
- Sharpe, A. (1996). *Química inorgánica*. Reverté.
- Sheng, Y., Abreu, I., Cabelli, D., Maroney, M., Miller, A., Teixeira, M., and Valentine, J. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. *American Chemical Society*.
- Silva, C., de la Fuente, J., and Bobrowski, K. (2012). *Estudio de los mecanismos de fotoreducción y fotooxidación de oxoisoaporfinas*. Universidad de Chile.
- Simic, M. and Jovanovic, S. (1989). Antioxidation mechanisms of uric acid. *American Chemical Society*.
- Sullivan, F., Bender, A., and Horvath, S. (1963). The aging cell. *Journal of the American Geriatrics Society*.
- Suzuki, T. (2007). Nitrosation of uric acid induced by nitric oxide under aerobic conditions. *Nitric oxide: biology and chemistry*.

Swaminathan, V., Madhavan, N., and Radhamony, D. (1980). The determination of the mechanism of solid state reactions from thermogravimetric data. *Thermochimica Acta*.

Teijón, J. and Garrido, A. (2006). *Fundamentos de bioquímica metabólica*. Editorial Tébar.

Tosato, M., Zamboni, V., Ferrini, A., and Cesari, M. (2007). *The aging process and potential interventions to extend life expectancy*.

Urbaniak, A., Molski, M., and Sajek, M. (2012). Quantum-chemical calculations of the antioxidant properties of trans-p-coumaric acid and trans-sinapinic acid. *Computational Methods in Science and Technology*.

Valenzuela, A. (2016). Acido úrico ¿un nuevo factor contribuyente al desarrollo de obesidad? *Revista chilena de nutrición*.

Vaquero, C. and de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, U. C. (2011). *Estrés oxidativo en el síndrome Down*. Universidad Complutense de Madrid.

Velasco, L. (2019). D-aminoácido oxidasa: una posible nueva diana para el tratamiento de la esquizofrenia.

Viña, J., Sastre, J., Anton, V., Bruseghini, L., Esteras, A., and Asensi, M. (1992). Effect of aging on glutathione metabolism. *Protection by antioxidants*.

Wei, C., Crane, B., and Stuehr, D. (2003). Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *American Chemical Society*.

## Apéndices

### Apéndice A. Cromatogramas de las curvas de calibración

A continuación se muestran los cromatogramas a los pH 4 (figura 24A), 4.5 (figura 24B), 5 (figura 24C), 5.5 (figura 24D), 6 (figura 24E), 6.5 (figura 24F) y 7 (figura 24G).

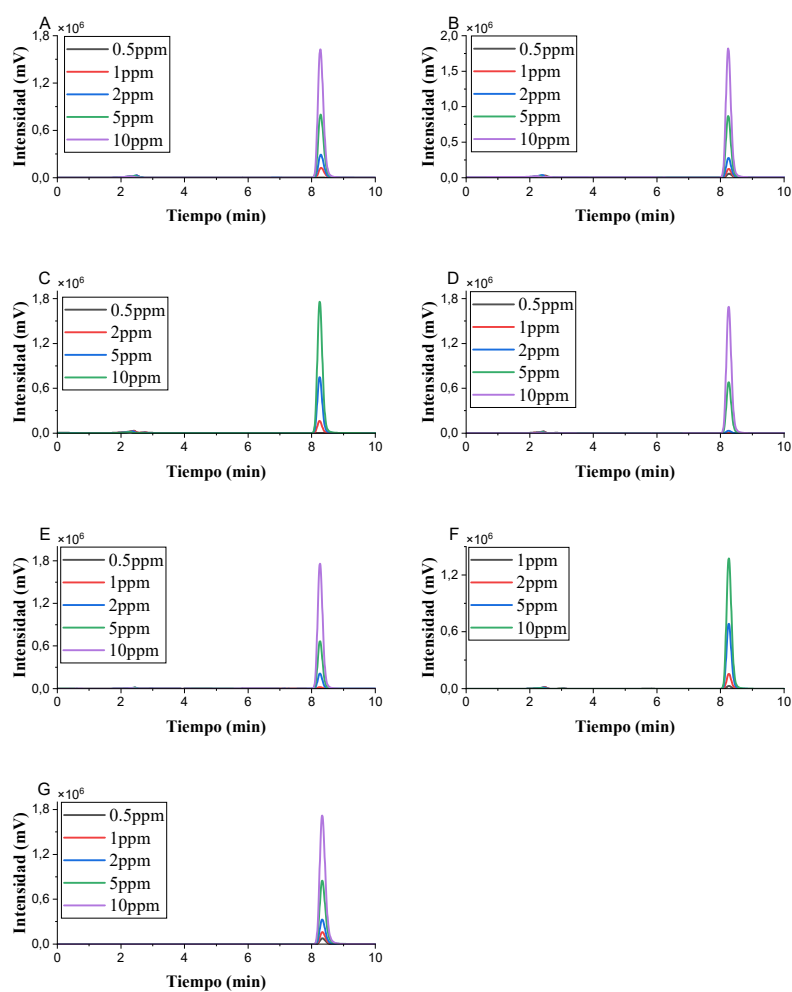


Figura 24. Cromatogramas de las curvas de calibración del tritófano

**Apéndice B. Cromatogramas de la fotooxidación de soluciones de TrpH**

A continuación se muestran los cromatogramas a los pH 4 (figura 25A), 4.5 (figura 25B), 5 (figura 25C), 5.5 (figura 25D), 6 (figura 25E), 6.5 (figura 25F) y 7 (figura 25G).

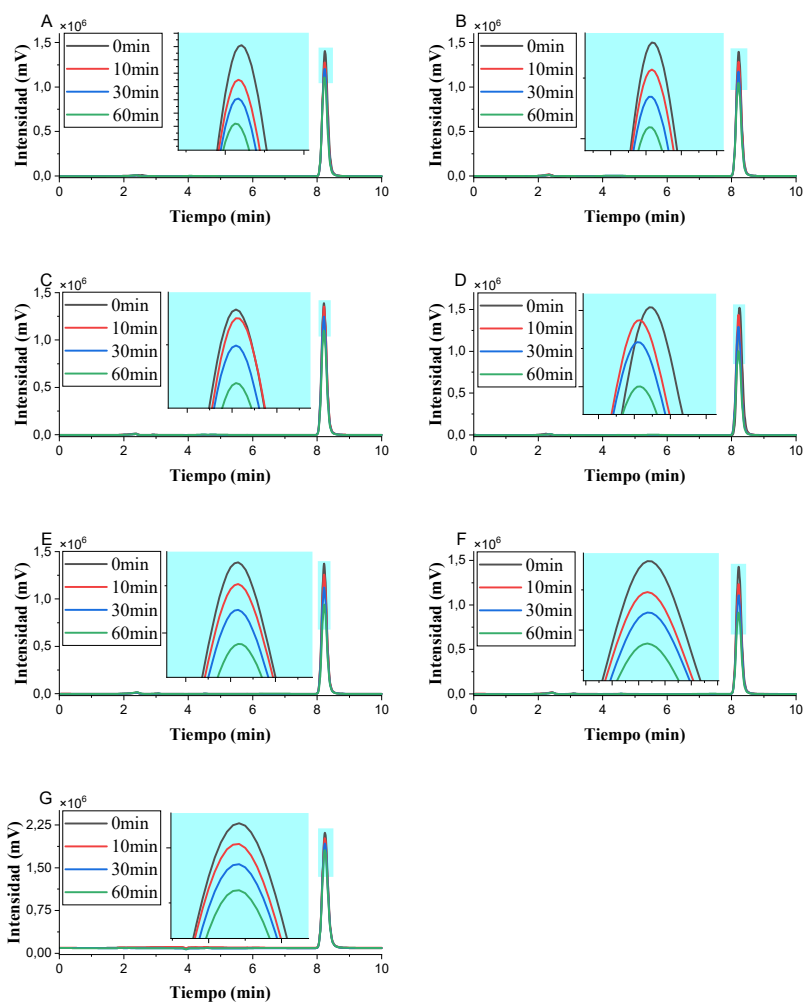


Figura 25. Cromatogramas de las soluciones fotooxidadas con solo triptófano

**Apéndice C. Cromatogramas de la fotooxidación de soluciones de TrpH en presencia de AU**

A continuación se muestran los cromatogramas a los pH 4 (figura 26A), 4.5 (figura 26B), 5 (figura 26C), 5.5 (figura 26D), 6 (figura 26E), 6.5 (figura 26F) y 7 (figura 26G).

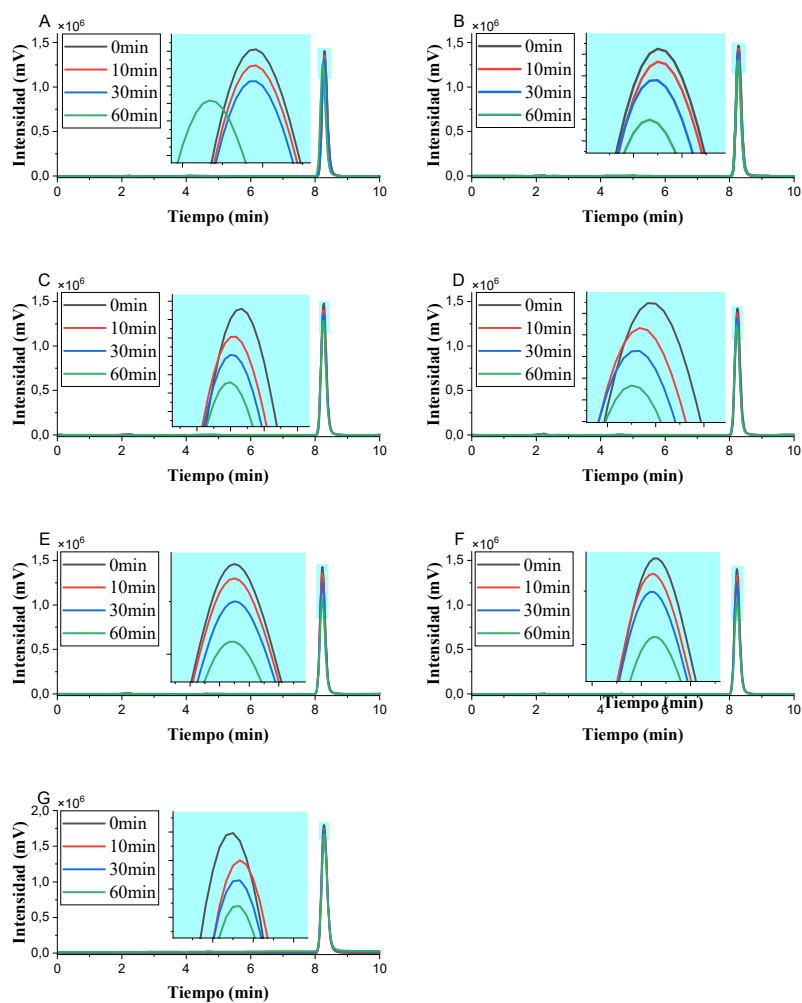


Figura 26. Cromatogramas de las soluciones fotooxidadas con triptófano y ácido úrico

**Apéndice D. Espectros UV-Vis de las soluciones de TrpH con AU tras 60 min de fotoxidación**

A continuación, se muestran los espectros UV-Vis de las soluciones de TrpH con AU tras 60 min de exposición a radiación UV de 255 nm a pHs 4, 5 ,6 y 7.

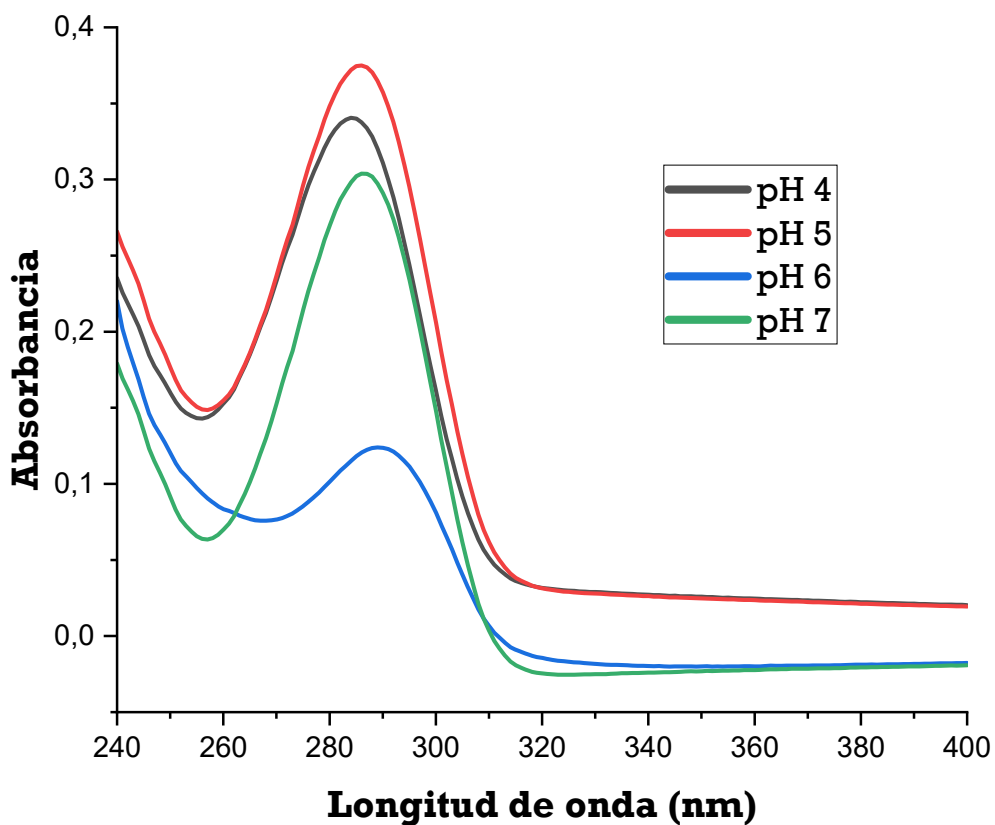


Figura 27. Espectros UV-Vis de las soluciones de TrpH con AU tras fotoxidación

**Apéndice E. Valores de  $k$  obtenidos por Muñoz (2017)**

A continuación, se muestran las constantes de velocidad  $k$  obtenidas por ?? mediante la metodología QM-ORSA.

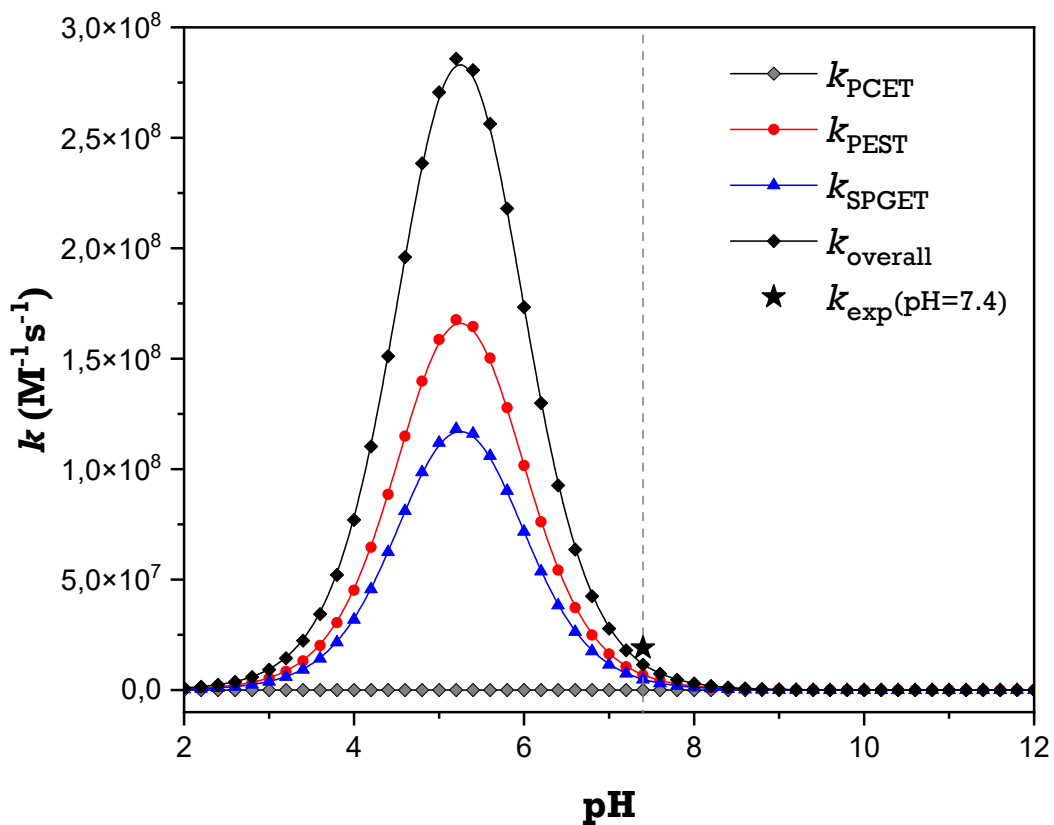


Figura 28. Constantes de velocidad  $k$  obtenidas por Muñoz (2017)