



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

*“EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA – ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS MEDIANTE MÉTODOS
COMPUTACIONALES”*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

SANTIAGO GONZÁLEZ CRISTOBALINA

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. ROSA ISELA GUZMÁN GERÓNIMO

DR. MARIO SÁNCHEZ VÁZQUEZ

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. MAYO DE 2007

A mis padres (los cuatro), por estar siempre a mi lado.

A Levi y Job, por ser mi inspiración y apoyo.

A mi abuelo (descanse en paz), por sus
enseñanzas.

... porque el gozo de Yahvé es vuestra fuerza.

(Nehemías 8:10)

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su misericordia en mi vida.

A mis padres, Hugo Santiago Ramírez y Florinda González Santiago, por el apoyo que me han dado para alcanzar el final de esta etapa.

A la Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo, por brindarme sus conocimientos y valioso apoyo.

Al Dr. Mario Sánchez Vázquez, por compartir sus conocimientos y apoyarme incondicionalmente.

Al Dr. Claudio Rubén Cadena Amaro, por el tiempo invertido para el apoyo y enriquecimiento de este proyecto.

A mis maestros, por orientar mi formación académica y personal.

A la profesora Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, por sus enseñanzas en el aula y en el ámbito personal.

A mis amigos de Ciencias empresariales, por su paciencia, comprensión y apoyo.

A Mónica, Jenny y Jeisel: sin ustedes no lo habría logrado.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la relación estructura–actividad antioxidante en antocianinas por medio de métodos computacionales con la finalidad de establecer qué propiedades electrónicas y estructurales favorecen su eficiencia como antioxidante. Para lograr este objetivo, se utilizaron programas computacionales tales como HyperChem versión 7.52, ChemCraft versión 1.5 y Gaussian 03. Con base en el método B3LYP/6-31G(d,p) se calcularon las distancias de enlace, entalpías de disociación de enlace y orbitales moleculares de las antocianinas: aurantinidina, cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina y peonidina. Al relacionar los datos obtenidos con la actividad antioxidante (medida experimentalmente como la capacidad de absorber radicales de oxígeno), se encontró que las energías de disociación de enlace calculadas indican que existe una relación directa entre esta propiedad y su capacidad antioxidante; de esta manera, la cianidina tiene el valor mayor en su capacidad para absorber radicales de oxígeno y el menor en cuanto a entalpía de disociación de enlaces. Lo anterior sugiere que, de acuerdo a la capacidad antioxidante, las antocianinas presentan el orden siguiente: cianidina > aurantinidina > malvidina > delfinidina > peonidina > pelargonidina. Aunque no existen datos experimentales del valor de capacidad antioxidante para aurantinidina, el lugar en el que se ha colocado es con base al valor de la energía de disociación de enlace.

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔH_f	Diferencia en calor de formación
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABC	Área bajo la curva
ABTS	Ácido 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
Ab initio	Desde los primeros principios
ADN	Acido desoxirribonucleico
AM1	Austin Model 1 (método semi-empírico)
B3LYP/D95	Método combinado de DFT (Becke, Lee-Yang-Parr, B3LYP) y funciones base
B3LYP/6-31G(d,p)	Método combinado de DFT y funciones base
CIS	Métodos más complejos de correlación electrónica y de mayor exactitud.
CLOA	Combinación lineal de orbitales atómicos
DFT	Density Functional Theory
DMPD	N,N'-dimetil- <i>p</i> -fenilendiamina
DMPO	N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EDE	Entalpía de disociación de enlace
EROs	Especies reactivas de oxígeno
HOMO	Highest occupied molecular orbital
LDL	Low-density lipoprotein
INDO1/S	Método semi-empírico parametrizado con base en el método de mecánica cuántica STO-3G
MC	Mecánica cuántica
MM	Mecánica molecular
MM+	Método de MM diseñado para moléculas orgánicas pequeñas.
MNDO	Modified Neglect of Diatomic Overlap
NBO	Natural bond orbital

NPA	Natural population analysis
ORAC	Oxygen radical absorption capacity
PI	Potencial de ionización
PPP	Método semi-empírico parametrizado para sistemas moleculares aromáticos con el método de mecánica cuántica usando el Orbital Tipo Slater
RHF	Restricted Hartree-Fock
RMN	Resonancia magnética nuclear
SEP	Superficie de energía potencial
SOMO	Single occupied molecular orbital
TAA	Actividad antioxidante total
TAR	Total antioxidant reactivity
TRAP	Técnica del potencial antioxidante total
UHF	Unrestricted Hartree-Fock
ZINDO/S	Método semi-empírico parametrizado especialmente para reproducir transiciones espectroscópicas

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS	5
2.1 Polifenoles	5
2.1.1 Flavonoides	5
2.1.2 Antocianinas	8
2.2 Actividad antioxidante	10
2.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante de compuestos bioactivos	13
2.4 Química computacional	15
2.4.1 Métodos utilizados en el modelado molecular	16
2.4.1.1 Mecánica molecular (MM)	16
2.4.1.2 Métodos electrónicos	16
2.4.2 Optimización de geometría	19
2.4.3 Energías	20
2.5 Estudio de la actividad antioxidante y reactividad de	23

polifenoles mediante ORAC y métodos teóricos	
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. HIPÓTESIS	30
6. MÉTODOS Y MATERIALES	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1 Geometría molecular	33
7.2 Análisis electrónico	38
7.2.1 Análisis de longitudes de enlace de las estructuras primarias y sus radicales más estables	43
7.2.2 Análisis de las diferencias de energías entre estructuras primarias y sus radicales	48
7.3 Cálculo de entalpías de disociación de enlace	50
7.4 Correlación entre la actividad antioxidante de las antocianinas evaluada por el método ORAC y EDEs relativas	57
8. CONCLUSIONES	59
9. PERSPECTIVAS	61
10. REFERENCIAS	62
11. APÉNDICE	68
11.1 Coordenadas cartesianas de las estructuras primarias	68
11.2 Coordenadas cartesianas de los radicales más estables	74
12. GLOSARIO	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación general de polifenoles	6
Figura 2.	Clasificación de los flavonoides	7
Figura 3.	Estructura y numeración de las antocianinas	9
Figura 4.	Superficie de energía potencial	20
Figura 5.	Sistemas de capa abierta y capa cerrada	22
Figura 6.	Estructura de la quercetina ra 5. Sistemas de capa abierta y capa cerrada	24
Figura 7.	Catión flavilio	26
Figura 8.	Numeración general de las antocianinas	33
Figura 9.	Estructuras optimizadas de las antocianinas calculadas con el método B3LYP/6-31G(d,p)	35
Figura 10.	Estabilización del radical generado por la eliminación de un átomo de hidrógeno	40
Figura 11.	Estructura de los radicales más estables de cada antocianina calculados por B3LYP/6-31G(d,p)	41
Figura 12.	Estructuras estabilizadas al menos por un puente de hidrógeno	43
Figura 13.	Orbitales SOMO de las estructuras radicales más estables	47
Figura 14.	Sitios de ataque de radicales libres en las antocianinas. Los números entre paréntesis son entalpías relativas en kcal/mol	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 15.	Gráfica que representa la relación directa entre ORAC y EDE	58
------------	--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Concentración de antocianinas presentes en frutas y vegetales	9
Tabla 2.	Clasificación de los métodos para evaluar actividad antioxidante de acuerdo a su mecanismo de acción	14
Tabla 3.	Valores de actividad antioxidante de antocianinas mediante ORAC	39
Tabla 4.	Diferencias en las distancias de enlace de C2-C1' para las antocianinas y sus radicales más estables (Å).	44
Tabla 5.	Diferencias en las distancias de enlace (C-O) para las antocianinas y sus radicales más estables (Å).	45
Tabla 6.	Energías calculadas para las antocianinas primarias (UHF/B3LYP/6-31G(d,p)) y sus respectivos radicales (RHF/B3LYP/6-31G(d,p))	49
Tabla 7.	EDE para antocianinas	52
Tabla 8.	Orden de reactividad de acuerdo a las diferencias de EDE (kcal/mol)	55

1. INTRODUCCIÓN

Del oxígeno consumido por el organismo humano, aproximadamente el dos por ciento se transforma en especies reactivas de oxígeno (EROs), al ser reducido parcialmente. Las EROs son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior y por tanto altamente reactivas.¹ Cuando la proporción de EROs sobrepasa las numerosas barreras de defensa del organismo (antioxidantes), se producen daños por lesión química a las estructuras biológicas, y este proceso es denominado *estrés oxidativo*.²

El daño oxidativo en las macromoléculas biológicas es de consecuencias críticas; los radicales libres reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN en el interior de las células y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que puede llevar a la muerte celular.³

Las defensas antioxidantes con que cuentan los organismos aeróbicos pueden ser de dos tipos: enzimático (endógenos) y no enzimático (exógenos). La primera defensa antioxidante es intracelular y la constituyen las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Mientras que, entre los antioxidantes no enzimáticos extracelulares se encuentran la vitamina C, vitamina E, carotenoides y polifenoles (presentes principalmente en frutas y vegetales).

Diversos estudios han demostrado que el consumo de frutos y vegetales ricos en sustancias antioxidantes, como los polifenoles, disminuyen los trastornos fisiológicos que los radicales libres producen en el organismo, tales como enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y neurológicas.⁴⁻⁷ Debido a lo anterior, dentro de la industria alimentaria ha cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en particular la capacidad antioxidante asociada a estos compuestos.

Dentro de los polifenoles, se encuentra un grupo denominado flavonoides, que son efectivos donadores de átomos de hidrógeno; en este grupo se incluyen a las antocianinas.⁸⁻¹²

En las antocianinas, el número y posición de los grupos hidroxilos presentes en la estructura influyen en su capacidad antioxidante, al igual que los grupos metilo, algunos azúcares y ácidos orgánicos. Estos compuestos polifenólicos se encuentran de forma aislada y combinada en frutos y vegetales.¹³⁻¹⁷

Las antocianinas son compuestos muy atractivos no sólo en el campo de los alimentos, ya que estudios realizados *in vitro* e *in vivo* para evaluar su actividad biológica, han demostrado que estas sustancias poseen efectos terapéuticos positivos en el tratamiento de la retinopatía diabética,¹⁸ y enfermedades relacionadas con la fragilidad capilar.^{16, 19} Asimismo, las antocianinas pueden tener un efecto potencial fisiológico como agentes antineoplásicos,²⁰ agentes protectores de la radiación,^{21, 22} agentes

vasotómicos,²³ agentes antiinflamatorios²⁴ y recientemente han demostrado ser eficientes en la disminución de glucosa en sangre.²⁵

Dados los efectos benéficos en la salud humana, se han hecho estudios desde el punto de vista tecnológico para utilizar estas sustancias en el desarrollo de alimentos funcionales y/o productos nutracéuticos. Sin embargo, aún no está completamente claro cómo se relacionan las propiedades anteriormente mencionadas con la estructura química de las antocianinas; y específicamente, no se conoce la relación estructura-actividad antioxidante.

Por lo anterior, el presente trabajo se enfoca principalmente a estos compuestos y tiene como objetivo principal estudiar la reactividad de las antocianinas (aurantinidina, cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina y peonidina) con la finalidad de establecer qué propiedades electrónicas y estructurales afectan dicha reactividad ante los radicales libres. Los estudios realizados a todas las estructuras son en su totalidad teóricos y las propiedades evaluadas fueron: geometría estructural (arreglo espacial de la molécula), entalpía de disociación de enlace O-H (que tan fuerte es éste enlace), distribución de carga (establecer que átomos tienen carácter positivo o negativo), densidad electrónica (análisis de los orbitales HOMO y SOMO, tanto de las antocianinas como la de sus radicales generados al remover un hidrógeno de cada grupo hidroxilo, respectivamente).

Finalmente, los resultados se relacionaron con los datos experimentales obtenidos mediante el método ORAC (Capacidad para absorber radicales de oxígeno, siglas en inglés) obtenidos por Wang y col.

(1997)¹⁷ para cinco (cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina y peonidina) de las seis estructuras de antocianinas estudiadas en este trabajo. A pesar de que no existen datos experimentales acerca de la capacidad antioxidante de la aurantinidina, en este trabajo se realizó una predicción y se estableció el orden que le corresponde en comparación con las cinco antocianinas antes mencionadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Polifenoles

Los compuestos polifenólicos constituyen un grupo amplio de sustancias que son consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8000 compuestos distintos. Los polifenoles son compuestos que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilo en su estructura, y se clasifican de acuerdo a su estructura química básica que se muestra en la **Figura 1**.⁷

2.1.1 Flavonoides

Estos compuestos fueron descubiertos por Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia (citrina), que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.

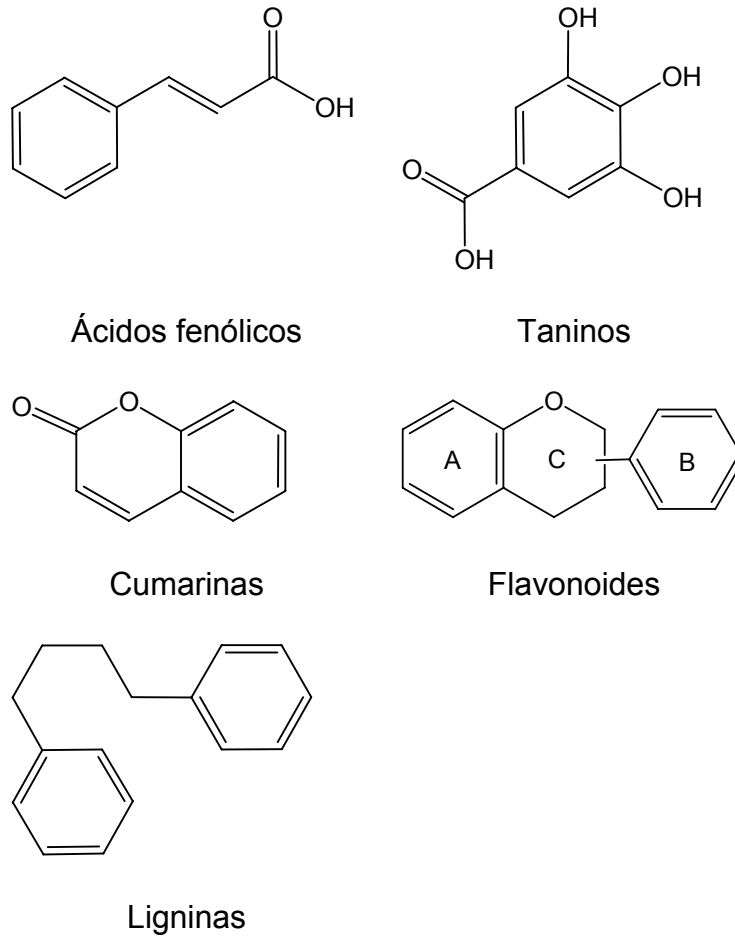
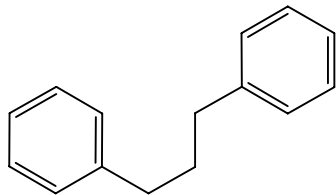


Figura 1. Clasificación general de polifenoles

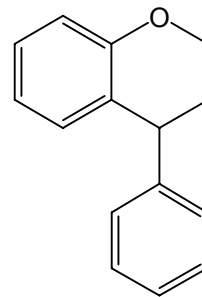
A la fecha se han identificado más de 5000 flavonoides, encontrándose en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya. Además de sus conocidas propiedades antioxidantes, estos compuestos polifenólicos desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización

y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.¹

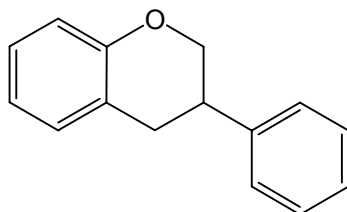
La palabra flavonoide se usa para hacer referencia a un conjunto de compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto C₆-C₃-C₆. Dependiendo de la posición del enlace del anillo fenil al benzopirano se lleva a cabo la clasificación que se muestra en la **Figura 2**.²⁶ El primer grupo denominado flavonoides menores es una excepción debido a que contiene una cadena abierta de 3 átomos de carbono uniendo a dos anillos fenilo.



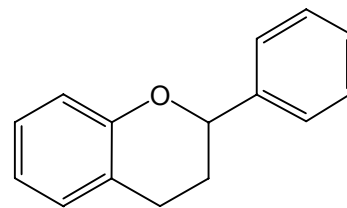
Flavonoides menores



Neoflavonoides



Isoflavonoides



Flavonoides

Figura 2. Clasificación de los flavonoides

Su actividad antioxidante depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación. Algunos investigadores indican que esta

propiedad también está relacionada con una geometría plana, ya que ésta permite una deslocalización mayor de los electrones a través de los anillos.²⁷

2.1.2 Antocianinas

La palabra antocianina se deriva del griego “*anthos*”, que significa flor y de “*kyanos*”, que significa azul oscuro. Estos compuestos son flavonoides que proporcionan color (rojo, naranja y azul) a las flores, frutos, vegetales y algunos tallos y raíces que las contienen (**Tabla 1**) y se localizan en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, dentro de las vacuolas de las células.^{17, 27, 28}

El consumo de antocianinas en la dieta humana es considerablemente mayor que de cualquier otro flavonoide y se estima en 185-215 mg/día/persona; el consumo se debe principalmente a la ingesta de frutas y vegetales como lo muestra la **Tabla 1**.^{27, 28} De acuerdo a estudios realizados, el consumo de las antocianinas en exceso no conlleva efectos negativos a la salud tanto en animales como en humanos.²⁷

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles constituidos por un sistema benzopirilio (A-C) y un anillo fenólico (B) como se observa en la **Figura 3**. Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes ya que su estructura presenta una gran deslocalización electrónica que conecta a los tres anillos (A, C y B), además los grupos OH en diferentes posiciones los hacen antioxidantes potencialmente buenos.²⁷

Tabla 1. Concentración de antocianinas presentes en frutas y vegetales

Fuente	Concentración (mg/kg)	Compuestos
Manzana	100 – 600	Cianidina, peonidina
Arándano	4600	Cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina
Zarzamora	820 – 1800	Cianidina, pelargonidina
Mora	1609	
Cereza	3500 – 4500	Cianidina, pelargonidina, peonidina
Uvas	300 – 7500	Cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina
Ciruela	19-250	Cianidina
Frambuesa	100 – 600	Cianidina, pelargonidina
Fresa	127 – 360	Cianidina, pelargonidina
Col roja	250	Cianidina
Pasa	119 – 186	Cianidina, delphinidina
Berenjena	7500	Delfinidina
Rábano	110 – 600	Pelargonidina
Papa roja	150 – 450	
Maíz negro	16420	Aurantidina
Cebolla roja	Más de 250	Cianidina

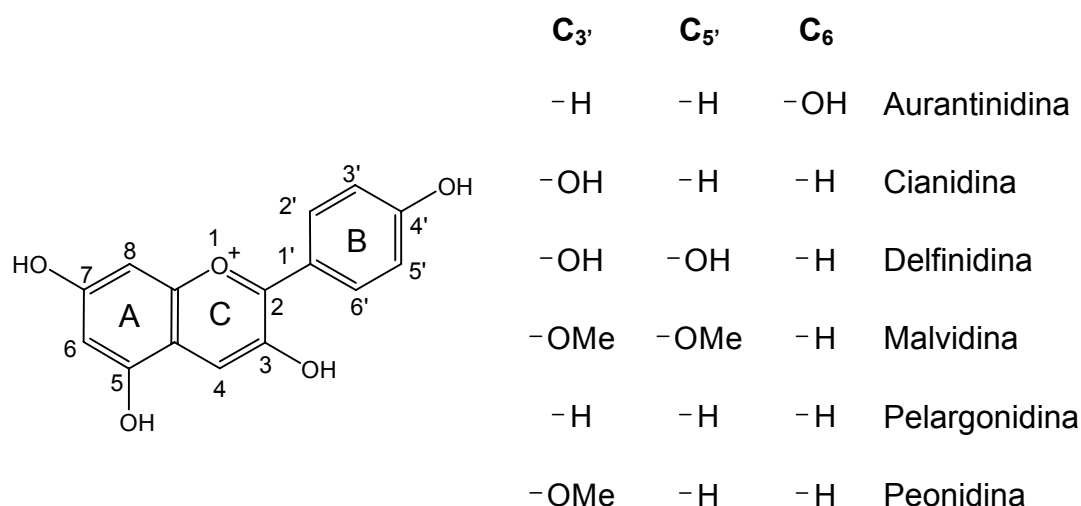


Figura 3. Estructura y numeración de las antocianinas

2.2 Actividad antioxidante

Para entender el concepto de actividad antioxidante es necesario hacer referencia a las especies reactivas de oxígeno y a los antioxidantes: Una especie reactiva de oxígeno es cualquier átomo o molécula con electrones desapareados, y por lo tanto, es una especie inestable. Entre estos podemos mencionar a los radicales, [ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($RO\cdot$), peroxilo ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno ($NO\cdot$)] y a los no radicales [peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete ($\cdot O_2$) y peroxinitrito ($ONOO^-$)]. Estas especies reactivas pueden ser generadas de forma endógena (metabolismo de la respiración, células fagocitarias, autoxidación de compuestos de carbono y la activación catalítica de algunas enzimas), y exógena (radiación, luz solar, tabaco, ozono, drogas, contaminantes y aditivos en alimentos).¹

Por otra parte, un antioxidante es una sustancia que, en bajas cantidades, actúa previniendo o retardando la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas.¹

Finalmente, la actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia antioxidante para disminuir la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, ADN).²⁹ Esto es de suma importancia debido a que las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones sobre el metabolismo que pueden ser el origen del daño celular, porque actúan:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).

2. Sobre los glúcidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.

3. Sobre las proteínas produciendo inactividad y desnaturalización.

4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el organismo también utiliza a los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores. Por lo tanto, el problema real se presenta cuando las EROs sobrepasan tanto las defensas endógenas como las exógenas ocasionando los daños antes mencionados¹.

Para comprender la forma en la que actúa un antioxidante frente a un radical libre es necesario conocer los dos tipos de mecanismos por los que puede actuar. A continuación, estos mecanismos se ejemplifican para antioxidantes fenólicos (en donde el término ArOH se refiere a un compuesto que contiene al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático).

El primer mecanismo implica la **transferencia de un átomo de hidrógeno** y se ilustra mediante la peroxidación lipídica en las **Reacciones 1-3**.



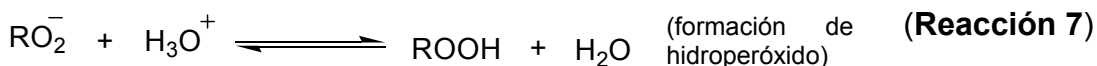
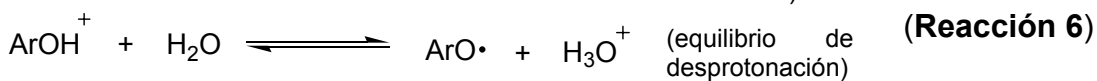
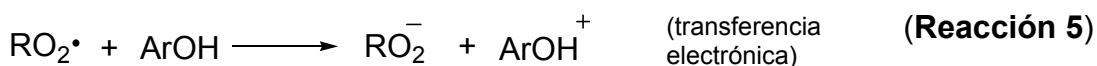
Una vez que se genera el radical $\text{R}\cdot$, las **Reacciones 2 y 3** forman una reacción en cadena que da origen a la formación de hidroperóxido lipídico (ROOH), dando lugar a la oxidación y rancidez de las grasas. La **Reacción 2** es mucho más rápida ($10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que la **3** ($10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{30, 31}

El papel del antioxidante ArOH es interrumpir la reacción en cadena de acuerdo a la reacción siguiente:



Para que $\text{ArO}\cdot$ sea efectivo, debe ser estable y reaccionar lentamente con el sustrato pero rápidamente con $\text{RO}_2\cdot$. Es importante que la energía necesaria para arrancar ese átomo de hidrógeno sea mínima para que se transfiera fácilmente hacia el radical libre.

Otro mecanismo, por el cual un antioxidante fenólico puede estabilizar un radical libre es por **transferencia electrónica**, donde se forma primero un radical catión seguido de una rápida formación reversible en solución:



Este mecanismo es aplicado cuando el compuesto objeto de estudio es altamente sensible al disolvente utilizado.

Cabe mencionar que la actividad antioxidante puede ser evaluada tanto experimental como teóricamente. Cada uno de los métodos que se enfoca en la evaluación de esta propiedad ofrece diferente confiabilidad de resultados. Si bien, las determinaciones hechas mediante métodos experimentales muestran el grado de interacción entre el radical libre y el antioxidante mediante un valor, los métodos teóricos pueden proporcionar los factores estructurales que provocan ese grado de interacción. Dentro de las herramientas teóricas más importantes tenemos a los métodos basados en la física cuántica, ya que, los resultados obtenidos son sumamente confiables y permiten disminuir el costo y número de ensayos experimentales.

2.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante de compuestos bioactivos

Los métodos para evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad antioxidante de compuestos bioactivos se clasifican de acuerdo al mecanismo mediante el cual actúan en: ensayos basados en transferencia de hidrógeno y transferencia de electrones (**Tabla 2**).¹⁷ La mayoría de los métodos basados en transferencia de hidrógeno presentan reacciones donde el antioxidante y el sustrato compiten por el radical libre (inhibición de la autooxidación de las lipoproteínas de baja densidad). Mientras que, los métodos que comprenden la transferencia de electrones se basan en la capacidad de un antioxidante

para reducir a un oxidante, lo cual origina un cambio de color cuando el oxidante es reducido. Así, el grado en el cambio de color se correlaciona con la capacidad antioxidante de la muestra.

Tabla 2. Clasificación de los métodos para evaluar actividad antioxidante de acuerdo a su mecanismo de acción

Mecanismo	Método
Transferencia de hidrógeno	a. TRAP (<i>Técnica del potencial antioxidante total</i>) b. ORAC (<i>Capacidad para absorber radicales de oxígeno</i>) c. Inhibición de la oxidación de las LDL (<i>Low-density lipoprotein</i>)
Transferencia electrónica	a. TAR (<i>Reactividad Antioxidante Total</i>) b. Método ABTS (<i>Ácido 2,2´azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)</i>) c. TAA (<i>Actividad Antioxidante Total</i>)

De los métodos mencionados, el más aplicado en compuestos polifenólicos es el método de ORAC; en el cual, se determina de forma directa la capacidad antioxidante hidrofílica frente a una fuente radicalaria, en donde se utiliza la proteína fluorescente R-ficoeritrina como sustrato oxidable y 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) como generador de radicales peroxilo o el sistema Cu^{2+} - H_2O_2 como generador de radical hidroxilo. Investigaciones posteriores cambiaron el uso de la ficoeritrina por fluoresceína, que es más estable y proporciona mejores resultados.³²

ORAC es el único método que registra la acción de la especie radicalaria hasta el final y usa el área bajo la curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia para realizar la cuantificación de la capacidad antioxidante.

De esta manera, la técnica considera tanto el porcentaje de inhibición como la extensión del tiempo de ésta en un solo valor.¹⁴ Ha sido empleado en análisis tanto de sustancias puras, mezclas de antioxidantes naturales, tejidos y fluidos biológicos; además, puede realizarse con diferentes especies reactivas de oxígeno (versátil) y tiene la posibilidad de detectar el efecto del antioxidante a nivel fisiológico.³²

Por lo anterior y debido a que ORAC es uno de los métodos más utilizados para determinar la capacidad antioxidante en polifenoles, en el presente trabajo se utilizan datos reportados en la literatura de la actividad antioxidante de las antocianinas evaluadas por este método.

2.4 Química computacional

La química computacional es una rama de la química basada en leyes de la física clásica y la física cuántica cuyo objetivo es crear algoritmos para el estudio y predicción de algunas propiedades moleculares como: energía, momento dipolar, frecuencias de vibración, distribución de carga, espectros de IR y RMN, etc. Esta poderosa herramienta ayuda a estudiar, a nivel electrónico, el comportamiento de compuestos como las antocianinas. La exactitud de los resultados varía de acuerdo al método utilizado.³³

2.4.1 Métodos utilizados en el modelado molecular

Los métodos implementados en cada programa de la química computacional pueden ser divididos de acuerdo al nivel de teoría, y son dos:

2.4.1.1 Mecánica molecular (MM)

Estos métodos están basados en las leyes de la física clásica para predecir las estructuras y propiedades de las moléculas. Ofrecen la ventaja de ser rápidos aún en moléculas con un número grande de átomos; sin embargo, sus limitaciones consisten en que sólo se pueden aplicar con buenos resultados en ciertos tipos de moléculas (especialmente orgánicas), además, no pueden resolver problemas que involucren efectos electrónicos ya que MM no toma en cuenta la propiedad de los electrones como onda.³³

2.4.1.2 Métodos electrónicos

Están basados en las leyes de la mecánica cuántica para el cálculo de la energía y otras propiedades de la molécula (se debe resolver total o parcialmente la ecuación de Schrödinger). Estos se dividen en tres tipos:

- **Semiempíricos.** Utilizan tanto la ecuación de Schrödinger como datos obtenidos de forma experimental. De los métodos clasificados como semiempíricos podemos mencionar algunos como MNDO, AM1 y PM3. En lo particular, se utiliza el método AM1 debido a que está bien parametrizado para moléculas orgánicas como las estudiadas en este trabajo.

- **Ab initio (desde los primeros principios).** Los cálculos basados en estos métodos comprenden la solución total o parcial de la ecuación de Schrödinger.

$$H\Psi = E\Psi$$

Donde

$$H = \left(-\frac{h^2}{8\pi^2 m} \nabla^2 + V \right)$$

Donde

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$

En la ecuación de Schrödinger, los términos h , m y V significan: h = constante de Plack, m la masa del electrón, y V es la energía potencial.³³ Los métodos *ab initio* se caracterizan por la introducción de funciones base expandiendo los orbitales moleculares de acuerdo al tipo de sistema molecular en estudio.

- **Teoría de la Densidad Funcional (DFT, Density Functional Theory).** Estos métodos son similares a los métodos *ab initio* en muchas maneras. Los cálculos DFT requieren de los mismos recursos que los de la teoría de Hartree-Fock, pero son menos costosos en tiempo de procesador que los *ab initio*. Los métodos DFT son atractivos porque incluyen efectos de *correlación electrónica*. Hartree-Fock considera a este efecto sólo como un promedio (cada electrón siente la presencia del resto pero como un promedio de su densidad electrónica), mientras que métodos que incluyen correlación electrónica toman en cuenta las interacciones instantáneas del par de electrones con espín opuesto. Esta aproximación causa que Hartree-Fock sea menos exacto para algunos sistemas moleculares.³⁴

La teoría de la densidad funcional predice muy bien la energía, a diferencia del conjunto de bases (*ab initio* basadas en la teoría Hartree-Fock) que sólo generan buenas geometrías. De esta manera al combinar ambos tipos de teorías se obtienen resultados más exactos.³³ En este trabajo se combinó el funcional B3LYP con el conjunto de bases 6-31G(d,p) para obtener el método B3LYP/6-31G(d,p). Esto significa que se combinó la Teoría de la Densidad Funcional (B3LYP) que da excelentes resultados en cuanto al cálculo de energías en las moléculas y la Teoría de Hartree-Fock (6-31G(d,p)), que proporciona muy buenas geometrías. Para entender el significado de los términos que se involucran en el método es necesario hacer un pequeño resumen de los sistemas base (basis set). Los sistemas base son cálculos matemáticos hechos mediante algoritmos al resolver la ecuación de Slater. Existen dos categorías de sistema base: mínimo (que proporciona información general de los orbitales) y el extenso (que proporciona información detallada). Las ecuaciones llamadas Orbital Tipo Slater (STO) son muy complejas y el costo computacional para resolver las ecuaciones es relativamente elevado. Gracias a investigaciones posteriores se encontró que se podía tener una buena aproximación al STO usando ecuaciones tipo Gaussian u Orbitales Tipo Gaussian (GTO); además, se sabe que entre mayor sea el número de GTO usadas, mejor será la aproximación al STO. Por ejemplo, en el método seleccionado para este proyecto (B3LYP/6-31G(d,p)), el 6 es el número de GTOs que describen a los electrones internos (en este caso los de los orbitales s); el 3 representa el número de GTOs para los electrones en los orbitales *sp* y el 1 los GTOs para

orbitales similares sp pero con diferente coeficiente. A este tipo de sistema se le conoce como sistema base de valencia dividida. En cuanto al método, (d,p), son una forma de expresar el grado de restricción o libertad que se le permite o no a un electrón en el espacio. A estas expresiones matemáticas se les denomina “funciones de polarización” y d significa que se le agrega la función del orbital d a los átomos pesados (en este caso al C y al O); mientras que p significa adicionar funciones p a todos los hidrógenos. De esta manera el electrón tiene menos restricción en el espacio de una forma matemática. Obviamente, el liberar el electrón repercute en el tiempo necesario para llevar a cabo los cálculos en el procesador.

2.4.2 Optimización de geometría

Al realizar una optimización de geometría, básicamente, el algoritmo basado en la combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA) para generar orbitales moleculares busca la conformación de una estructura molecular que represente un mínimo de energía potencial. Esto con la finalidad de obtener una estructura más estable con la que se puede predecir una gama de propiedades estructurales y electrónicas.³⁴

Los cambios realizados en una estructura molecular ocasionan cambios en la energía y otras propiedades; la relación existente entre esas variaciones se conoce como Superficie de Energía Potencial (SEP).

Graficando en los ejes X y Y a la SEP y en el eje de la Z a la energía, se obtiene una superficie real en 3D donde se perciben máximos y mínimos

(locales y globales); así, para cada punto se tiene una energía y una estructura especial (**Figura 4**).

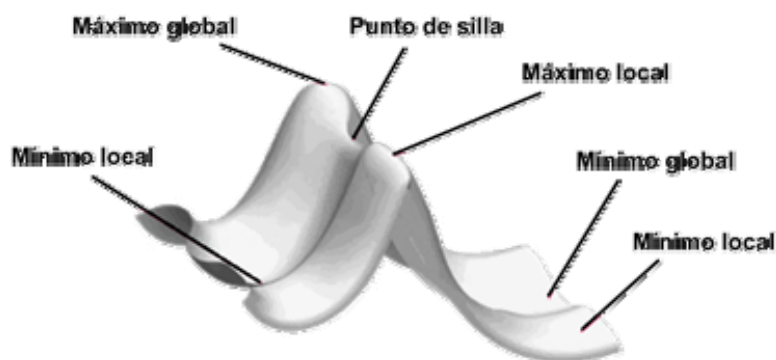


Figura 4. Superficie de energía potencial

Al optimizar una geometría se busca hallar el mínimo global con lo que se asegura la estructura de estabilidad máxima. Cuando se realiza un cálculo en cualquier punto sobre la SEP, se está calculando solamente la energía a ese punto.

2.4.3 Energías

El análisis energético calculado en *Gaussian*, basado en las frecuencias vibracionales armónicas, predice automáticamente los valores termodinámicos a 298.15 K y a 1.0 atm.

E_{elec} = La energía electrónica total es calculada en un modelo teórico dado. Esta es la energía de un sistema molecular dado bajo un estudio relativo que separa a los núcleos de los electrones.

ZPE = Corrección de energía al punto cero, es el resultado del movimiento vibracional del sistema molecular aún a 0 K, y se calcula por un

modelo de un oscilador armónico como la suma de las contribuciones de todos los modos vibracionales del sistema.

E_0 = La energía total al punto cero es la suma de la energía electrónica total (E_{elec}) y la energía corregida al punto cero (ZPE):

$$E_0 = E_{\text{elec}} + \text{ZPE}$$

En otras palabras, la energía obtenida de una estructura que se ha optimizado es la suma de la energía electrónica y la energía de repulsión nuclear de la molécula a la configuración nuclear especificada (*energía electrónica total*). Sin embargo, los valores energéticos pueden ser más exactos si se corrigen calculando la energía al punto cero.

Cuando se quiere predecir la energía de un sistema a temperaturas más altas, se le debe agregar la corrección térmica (calculada a partir de los modos vibracionales al punto cero), la cual incluye los efectos de traslación, rotación y vibración molecular a la temperatura y presión especificada.

La *energía vibracional* es aquella energía que existe debido al movimiento entre los átomos que conforman una molécula; dicho movimiento está relacionado con la temperatura (a mayor temperatura, mayor movimiento vibracional), aunque las variaciones no son considerables.

La *energía de atracción núcleo – electrón* es la energía con la cual un núcleo atrae hacia sí a un electrón “propio” o bien, que “pertenece” a otro núcleo.

La *energía de repulsión núcleo – núcleo* es la energía con la cual dos núcleos se repelen entre sí debido a la igualdad de sus cargas.

Por otra parte, como información para próximas partes del trabajo debemos señalar que las estructuras de radicales libres generadas a partir de su respectiva estructura primaria que contienen números desiguales de espines etiquetados como α y β se les denomina en química teórica de “capa abierta” o UHF (Unrestricted Hartree-Fock, siglas en inglés), mientras que a las estructuras primarias se les denomina de “capa cerrada” o RHF (Restricted Hartree-Fock), es decir, en cada orbital ocupado existe un par de espines α y β (**Figura 5**).

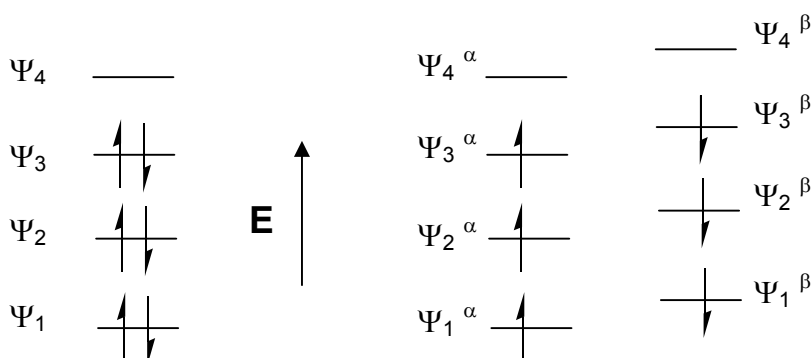


Figura 5. Sistemas de capa abierta y capa cerrada

Al observar el diagrama podemos notar que la restricción que se lleva a cabo se refiere a forzar a que los orbitales contengan un electrón α y otro β . Cuando no se restringe puede haber sólo uno de los dos tipos de electrones en el orbital; y como tienen más “espacio”, estos cálculos se llevan más tiempo.

2.5 Estudio de la actividad antioxidante y reactividad de polifenoles mediante ORAC y métodos teóricos

En cuanto a estudios experimentales en antocianinas, Wang y col. (1997)¹⁷ determinaron la capacidad antioxidante de 14 antocianidinas y sus agliconas mediante el método experimental ORAC, en donde observaron el efecto de las sustituciones de grupos hidroxilo y metoxilo en las propiedades antioxidantes de las antocianinas.

Estos autores reportaron que la cianidina 3-glicosilada tiene 3.5 veces mayor poder antioxidante que el Trolox (análogo de la vitamina E) y que la pelargonidina tiene la menor actividad del grupo de compuestos evaluados. En cuanto a las antocianinas delphinidina, cianidina, pelargonidina, malvidina y peonidina señalaron que los compuestos con un solo grupo hidroxilo (C₄-OH) en el anillo B (malvidina, pelargonidina y peonidina) tienen menor actividad antioxidante que aquellos que tienen dos grupos OH (C₃, C₄-di-OH) unidos al mismo anillo (cianidina). Sin embargo, aunque la delphinidina tiene tres sustituyentes OH en el anillo B, y en contra de lo esperado, tiene un valor de capacidad antioxidante menor.

Si bien, estudios realizados en otros flavonoides indicaron que el incremento de grupos hidroxilo aumentan la capacidad antioxidante,¹⁶ esto no parece ser verdad para las antocianinas dado que la hidroxilación en la posición 5' del anillo B disminuye el valor de ORAC en presencia de los grupos OH en posición 3' y 4'.¹⁷

Por otra parte, el estudio teórico de flavonoides, especialmente de la estructura de la quercetina sugiere que existen varios factores estructurales

para que un flavonoide tenga una buena capacidad antioxidante.^{35, 36} Los factores electrónicos y estructurales en la quercetina son los siguientes **(Figura 6)**:

- 1) Dos sustituyentes hidroxilo en posición *orto* en el anillo aromático B.
- 2) El doble enlace entre el carbono 2 y 3, el cual permite la deslocalización electrónica π desde el anillo aromático B hacia el resto de los anillos A y C.
- 3) Los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5, y una función oxo en el anillo C.³⁷

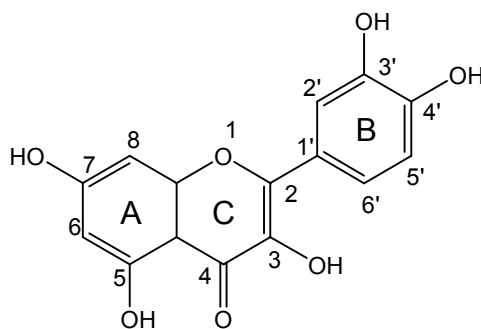


Figura 6. Estructura de la quercetina

Por otra parte, Van Acker y col. (1996),³⁶ utilizaron la base 6-31G para optimizar estructuras de algunos flavonoides y calcularon el calor de formación para las estructuras primarias y sus radicales (de aquí en adelante se empleará el término *molécula primaria* para designar a la estructura de la antocianina cargada positivamente). Ellos concluyeron que la estructura plana de algunos flavonoides se debe a la conjugación electrónica a través de su estructura, lo que favorece su capacidad antioxidante. Así mismo, señalaron que el anillo B es el más importante en la formación del radical más estable para los flavonoides taxifolina y quercetina. Sin embargo, de acuerdo a datos experimentales, concluyeron que para otros flavonoides,

como las flavonas, el sitio más reactivo (más importante en cuanto a propiedades antioxidantes), es el OH en la posición C₃.

Otros estudios teóricos utilizando métodos como AM1 y RHF/6-31G(d) se llevaron a cabo para evaluar el SOMO, HOMO y la EDE de flavonoides como la taxifolina, en donde los datos obtenidos indican que los grupos OH en posición 3' y 4' son los que transfieren mayormente su átomo de hidrógeno y generan una deslocalización electrónica.³⁸

En cuanto a estudios teóricos realizados en antocianinas, Bendz y col. (1967)³⁹ calcularon las estructuras electrónicas π de una serie de compuestos flavilio utilizando el método semi-empírico PPP con la finalidad de analizar el carácter electrónico en el estado de mínima energía en términos de cargas atómicas y órdenes de enlace reportando las estructuras más estables y sus energías de excitación.³⁹⁻⁴⁷

Rastelli y col. (1993)⁴⁶ investigaron la estabilidad de los tautómeros de tres antocianinas: apigeninidina, pelargonidina y cianidina, empleando métodos semi-empíricos, como AM1; encontraron que cada forma tautomérica puede existir de manera estable y que un factor importante que determina su estabilidad es la deslocalización electrónica π .

Por otra parte, Pereira y col. (1996)⁴³ utilizando métodos semi-empíricos AM1 y *ab initio* calcularon los orbitales moleculares, distribuciones de carga y órdenes de enlace en el catión flavilio (**Figura 7**) y sus derivados hidroxilados. Así mismo, analizaron las estructuras de los derivados hidroxilados en el anillo B. Estos autores reportaron que sustituyentes

hidroxilo en el anillo B, excepto el de la posición 3', causan un incremento en el flujo electrónico en el enlace $C_2-C_{1'}$.⁴⁴

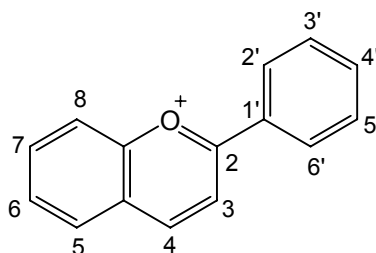


Figura 7. Cation flavilio

Recientemente, Sakata y col. (2006)⁴⁸ realizaron un estudio teórico para investigar el mecanismo de la variación de color en flores conteniendo antocianinas, utilizando métodos de la teoría de la densidad funcional (B3LYP/D95) y señalaron que los grupos hidroxilo en la posición 6 en el anillo A incrementan la energía de excitación, mientras que el resto de los hidroxilos en el anillo B disminuyen las energías de excitación. También reportan que las estructuras planas son ligeramente más estables que las no-planas por aproximadamente 3.5 kcal/mol. Esta diferencia geométrica juega un papel importante en la deslocalización electrónica de los radicales y por lo tanto en la actividad antioxidante.

Leopoldini y col. (2004)⁴⁹ evaluaron compuestos fenólicos presentes en la “dieta del mediterráneo” empleando el método B3LYP/6-31G para optimizar la geometría de las estructuras. Posteriormente, calcularon energías de esas estructuras optimizadas utilizando el método B3LYP/6-311++G(3df,2p). Los datos así obtenidos indicaron que para el caso de la cianidina, los radicales más estables en fase gaseosa son los correspondientes a las posiciones $C_2 > C_5 > C_4 > C_3 > C_7$; mientras que en fase

acuosa el radical más estable corresponde al radical en la posición C₄' seguido por el de la posición C₃'.

3. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios manifiestan que existe una relación directa entre el consumo de frutos y vegetales y la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, debido a que estos alimentos son ricos en compuestos bioactivos como los polifenoles. En la actualidad, este grupo de fitoquímicos, en especial las antocianinas, presentan gran interés debido a sus efectos benéficos en la salud, por lo que numerosas investigaciones han sido enfocadas para evaluar sus propiedades biológicas; sin embargo, la información existente en cuanto a los factores estructurales que influyen en estas propiedades es escasa o nula.

Ante ello, surge la necesidad de realizar estudios teóricos que permitan conocer la relación que existe entre su estructura química y sus propiedades biológicas como es su capacidad para actuar como antioxidantes, por lo que utilizando métodos electrónicos en el análisis de las propiedades estructurales de las antocianinas, tales como distancias de enlace, energía de disociación de enlace, orbitales moleculares (HOMO y SOMO), entre otros se podrá determinar cual de estos factores contribuye en mayor proporción a su actividad antioxidante y predecir la reactividad de estos compuestos.

Para evaluar la capacidad antioxidante de las antocianinas con mayor presencia en frutos y vegetales, se seleccionaron a aurantinidina, cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina y peonidina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar la relación estructura–actividad antioxidante en antocianinas por medio de métodos electrónicos para conocer los factores que inhiben o favorecen su eficiencia como antioxidantes.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer la geometría más estable de las antocianinas utilizando métodos electrónicos con la ayuda de software como: Gaussian 03, ChemCraft 1.5 y HyperChem 7.52.
- Establecer el grado de reactividad de los grupos hidroxilo presentes en las antocianinas, calculando la energía de disociación de enlace O-H (EDE)
- Calcular la estabilidad de los radicales libres en antocianinas.
- Calcular y analizar los orbitales moleculares HOMO y SOMO.
- Relacionar los resultados obtenidos mediante métodos computacionales con la actividad antioxidante de las antocianinas determinada experimentalmente mediante ORAC.

5. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante de las antocianinas se incrementa conforme aumenta el número de grupos hidroxilo presentes en su estructura.

6. MÉTODOS Y MATERIALES

La construcción de moléculas se llevó a cabo en el programa HyperChem versión 7.52 minimizando la geometría con el método MM+ de MM implementado en el mismo programa.⁵⁰ Posteriormente, todas las estructuras fueron refinadas y optimizadas con el programa GAUSSIAN 03⁵¹ (2004) instalado en una computadora personal (PC) con Windows XP, Procesador Intel Pentium 4 y en una computadora Compaq Tru64 UNIX V5.1. Las geometrías fueron optimizadas utilizando teoría de densidad funcional (DFT) con el método híbrido de Becke (1993),⁵² y el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr (B3LYP) (1988)⁵³ en conjunción con las funciones base 6-31G(d,p). Estas últimas funciones base son una combinación de expresiones matemáticas que dan mayor exactitud a los resultados (B3LYP/6-31G(d,p)). El análisis NBO (Natural Bond Analysis) para las estructuras radicales de menor energía se llevó a cabo al mismo nivel de teoría. Este análisis se basa en examinar todas las posibles interacciones entre los átomos donadores y los átomos aceptores estimando sus energías por medio de la teoría de perturbación de segundo orden. Para cada donador NBO (i) y cada aceptor (j), la energía de estabilización $E(2)$ asociada con la deslocalización (estabilización de $2e$) $i \rightarrow j$ es estimada como: $E(2) = \Delta E_{ij} = q_i [F_{(i,j)}^2 / (\epsilon_j - \epsilon_i)]$. Donde q_i es el orbital donador ocupado, mientras ϵ_i y ϵ_j son los elementos diagonales (energías del orbital) y $F_{(i,j)}$ es la diagonal de la matriz de Fock. La visualización de resultados y las gráficas

de las estructuras se hicieron con la ayuda del programa ChemCraft versión 1.5.⁵⁴

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se calcularon las estructuras de las seis antocianinas mediante el método semiempírico AM1 con lo que se obtuvieron las estructuras más estables para cada antocianina. Posteriormente estas estructuras se llevaron a un nivel más alto de teoría: la combinación de métodos *ab initio* y densidad funcional (B3LYP/6-31G(d,p)) para obtener valores más confiables de energía y geometría. Los resultados que se presentan corresponden a los obtenidos mediante este último método.

Para poder explicar de manera acertada las propiedades estructurales de las antocianinas es necesario establecer la numeración de sus átomos tanto de carbono como de oxígeno (**Figura 8**).

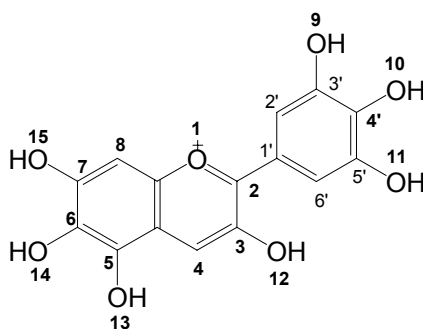


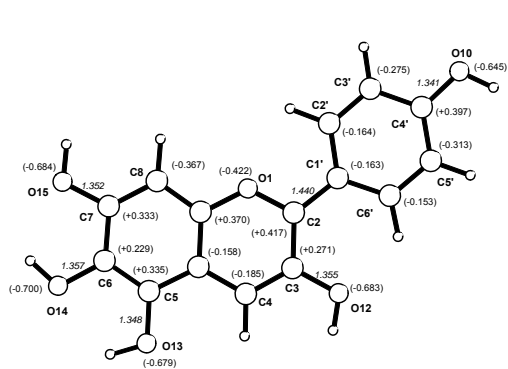
Figura 8. Numeración general de las antocianinas

7.1 Geometría molecular y órdenes de enlace

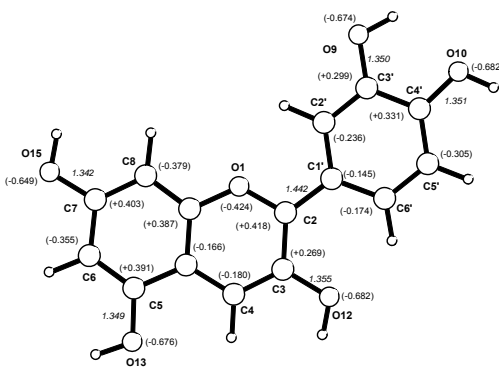
Los resultados obtenidos en cuanto a la optimización de la geometría indican que las seis antocianinas presentan una geometría molecular plana

(Figura 9), es decir, el ángulo de torsión entre $O_1-C_2-C_1-C_2'$ es de 0° , lo que concuerda con lo reportado por Sakata y col. (2006).⁴⁸ Utilizando el método B3LYP/D95, estos autores encuentran que existen dos geometrías posibles para la estructuras de las antocianinas: la geometría plana y la no plana, y concluyen que la estructura plana es más estable por 3.4 kcal/mol para la pelargonidina.

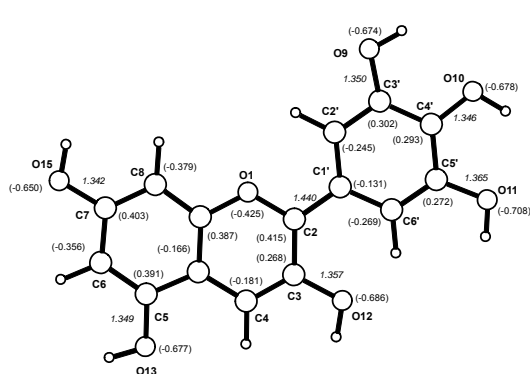
En cuanto a la optimización de geometrías, los datos obtenidos sugieren que la estabilidad de las estructuras planas de las antocianinas se debe principalmente a la deslocalización electrónica que existe con el buen traslape de los orbitales moleculares entre los anillos A, B y C. Los hidrógenos unidos a cada grupo hidroxilo o metoxilo están orientados de manera que puedan eliminar o disminuir el congestionamiento estérico. Ésta orientación de los hidrógenos es importante porque afecta la EDE y aumenta o disminuye la estabilidad de la estructura; principalmente en aquellas donde se encuentran grupos hidroxilo o grupos metoxilo vecinos, como se muestra en la **Figura 9**. Dichos grupos pueden formar puentes de hidrógeno dependiendo de su orientación espacial, tal es el caso de aurantinidina, cianidina y delphinidina, que poseen al menos un puente de hidrógeno cuyo rango para esta interacción va desde 2.01 a 2.59 Å.



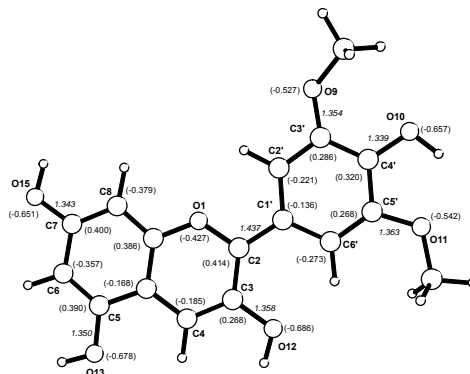
Aurantidina



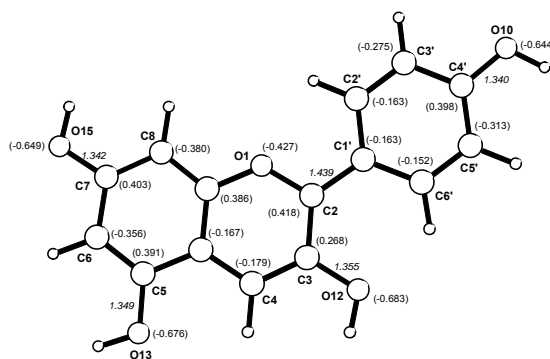
Cianidina



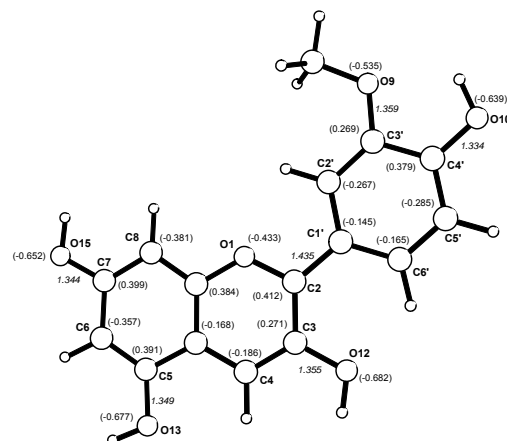
Delfinidina



Malvidina



Pelargonidina



Peonidina

Figura 9. Estructuras optimizadas de las antocianinas mediante el método B3LYP/6-31G(d,p)

Las estructuras de algunas antocianinas estudiadas experimentalmente por medio de difracción de rayos X, tales como la pelargonidina y cianidina,^{55, 56} demuestran que en estado sólido el ángulo de torsión $O_1-C_2-C_{1'}-C_{2'}$ es de 3.8° para la pelargonidina, y 10.1° para la cianidina. Estos ángulos se deben a que en estado sólido la formación de la red cristalina depende de la orientación espacial de los átomos, la cual se ve favorecida tanto por interacciones intramoleculares (puente de hidrógeno) como intermoleculares. Por lo tanto en fase sólida, la orientación de los hidrógenos unidos a los átomos de oxígeno es diferente respecto a la estructura en fase gaseosa, ya que la molécula no tiene la influencia de otra estructura que modifique su orientación espacial.

La **Figura 9** muestra las estructuras de menor energía caracterizadas como mínimos verdaderos. Al igual que para las estructuras radicales, los modos vibracionales fueron calculados al mismo nivel de teoría [B3LYP/6-31G(d,p)] y se observa que todas las frecuencias de las estructuras fueron positivas (números reales); por lo tanto, se confirma que corresponden a mínimos verdaderos en la SEP.

La distribución de cargas fue calculada en términos de las cargas naturales de Lewis. El valor más negativo en cada estructura pertenece a los oxígenos O_{14} (aurantinidina, -0.700), O_{10} (cianidina, -0.682), O_{11} (delfinidina, -0.708), O_{12} (malvidina, -0.686), O_{12} (pelargonidina, -0.683) y O_{12} (peonidina, -0.682). Estas cargas negativas correspondientes a los oxígenos, proporcionan una primera idea del lugar donde se formará el radical más

estable de cada estructura. Esta predicción es correcta para todas las estructuras excepto para la delfinidina.

Por otra parte, el orden de enlace (distancias de enlace) entre los $C_2 - C_{1'}$ en todas las estructuras (**Figura 9**), da un indicio de qué tanta densidad electrónica se está compartiendo (conjugando) entre los dos sistemas de anillos (A-C a B o viceversa), y del traslapamiento de los orbitales p a través de los C_2 y $C_{1'}$ localizados en los anillos C y B, lo cual genera el siguiente orden: peonidina > malvidina > pelargonidina > delfinidina \approx aurantinidina > cianidina. Esto significa que la peonidina tiene la distancia de enlace más pequeña, y por lo tanto, el mayor flujo electrónico a través del enlace $C_2-C_{1'}$.

Así mismo, el análisis de la distribución de carga en el anillo C muestra que la densidad electrónica se concentra en el O_1 y O_{12} ; mientras que los C_2 y C_3 se encuentran deficientes de carga. En el presente trabajo también se observa que el valor de las cargas en los átomos de oxígeno (O_{12}), unidos al C_3 de las antocianinas primarias (**Figura 9**) es similar en todas las estructuras y está en un intervalo de -0.682 a -0.686. Además, el valor de las cargas de los C_2 y C_3 es positivo debido al efecto inductivo electro-atractor que ejerce el átomo de oxígeno (O_1) en el anillo C al tratar de compensar su deficiencia electrónica. Lo anterior sugiere que el sitio más reactivo se encuentra en el OH unido al C_3 y coincide con lo reportado por Van Acker y col. (1996).³⁶ Sin embargo, el análisis electrónico realizado en el presente trabajo indica que, en algunas antocianinas, los grupos OH en los anillos A y B tienen mayor concentración electrónica (ver valores de cargas en la **Figura 9**) que el O_{12} debido a que esos oxígenos tienen grupos OH en

posición *orto*. Cuando esto ocurre, se forman puentes de hidrógeno que estabilizan a la molécula al tiempo que modifican la posición del sitio más reactivo, es decir, ya no es el OH en el C₃ sino alguna otra posición dependiendo de estructura de la antocianina.

7.2 Análisis electrónico

Si bien la presente investigación comprende sólo el estudio teórico de la estructura de las antocianinas, cabe mencionar que hasta el momento no existe un estudio que relacione sus propiedades estructurales con la actividad antioxidante de estos compuestos. Con base en lo anterior, en este estudio los resultados obtenidos teóricamente se relacionan con datos reportados en la literatura por Wang y col. (1997)¹⁷ quienes evaluaron esta propiedad biológica de las antocianinas, a excepción de la aurantinidina, mediante el método ORAC. En la **Tabla 3** se muestran los valores obtenidos para estos compuestos, en donde se puede observar que la antocianina que presenta mayor actividad antioxidante es la cianidina, mientras que la pelargonidina presenta la menor actividad. Wang y col. (1997)¹⁷ reportan que existe una relación directa entre el número de grupos hidroxilo y la capacidad antioxidante. Sin embargo, la delfinidina parece ser la excepción debido a un tercer grupo OH en el anillo B en el C_{5'} que disminuye su capacidad antioxidante en vez de aumentarlo. Dicho fenómeno no pudo ser explicado por ellos. Otros autores han concluido que la actividad antioxidante en flavonoides no sólo está relacionada con el número de grupos hidroxilo en el anillo B, sino también con factores como el grado de deslocalización

electrónica (acortamiento del enlace C₂-C_{1'}) entre los tres anillos A, B, C, el número de grupos hidroxilo en toda la estructura y por último la energía de disociación de enlace.^{38,39} De ahí la necesidad de efectuar un análisis electrónico para comprender a nivel estructural la actividad antioxidante de las antocianinas.

Tabla 3. Valores de actividad antioxidante de antocianinas mediante ORAC

Antocianina	ORAC (µM equivalente Trolox/L)
Cianidina	2.239 ± 0.029
Delfinidina	1.809 ± 0.069
Malvidina	2.009 ± 0.167
Pelargonidina	1.540 ± 0.033
Peonidina	1.693 ± 0.035

Para poder llevar a cabo un análisis electrónico de las antocianinas, es necesario conocer las estructuras radicales generadas a partir de las estructuras primarias y calcular sus propiedades electrónicas, y así determinar cuál de los radicales formados para cada antocianina es el más estable.

Una vez realizado el análisis, se observa que la capacidad antioxidante no depende totalmente del radical más estable como algunos autores lo mencionan en otros flavonoides y estructuras relacionadas sino a una serie de factores que se mencionan posteriormente.^{31, 38, 57} Además, gracias a ellos se puede explicar el fenómeno de la disminución de la actividad antioxidante cuando se tienen tres grupos hidroxilo en el anillo B.

Para poder entender la explicación a esto, primero hay que analizar como se lleva a cabo la eliminación de cada átomo de hidrógeno perteneciente a cada grupo hidroxilo: al remover cada hidrógeno unido a cada átomo de oxígeno, se observa un rearrreglo en la orientación de los hidrógenos vecinos al átomo de oxígeno (O·). Este comportamiento ya ha sido estudiado anteriormente (**Figura 10**).³¹ Se ha demostrado que esta reorientación favorece la estabilización de un radical, tal y como se prueba también en el presente trabajo (**Figura 11**).

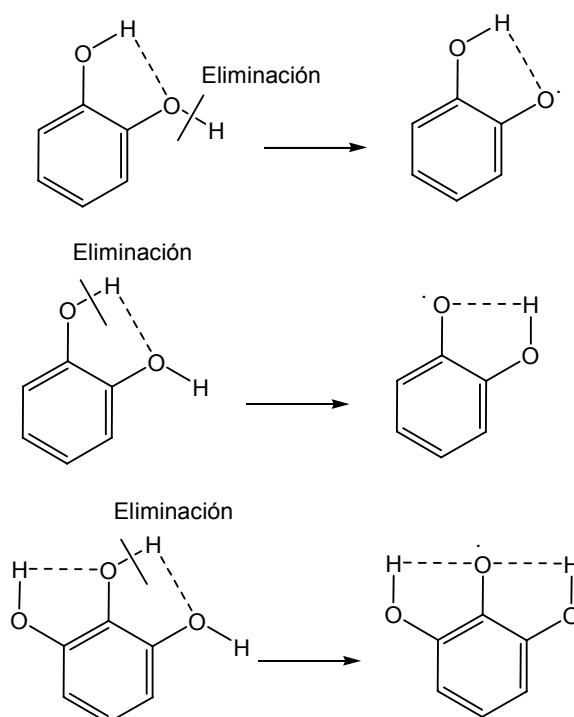
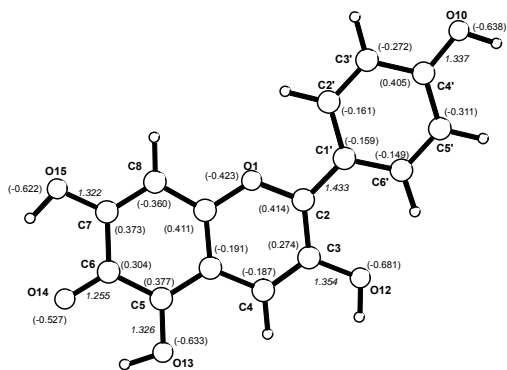
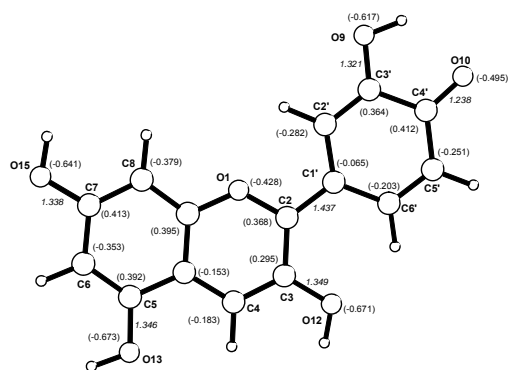


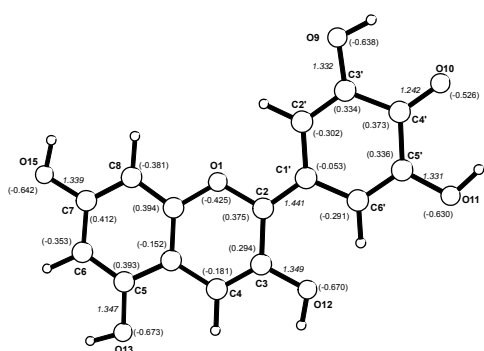
Figura 10. Estabilización del radical generado por la eliminación de un átomo de hidrógeno



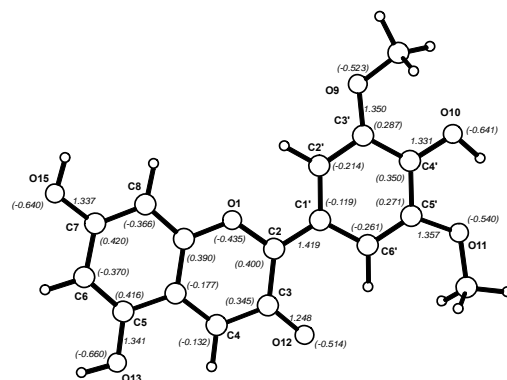
Aurantidina



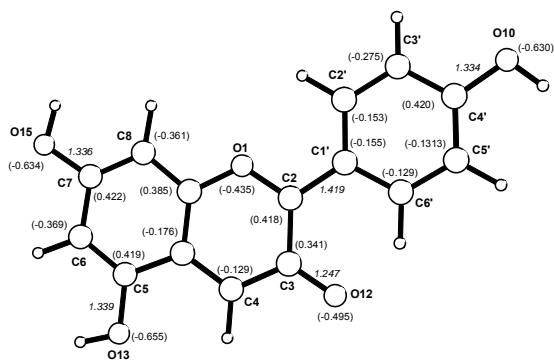
Cianidina



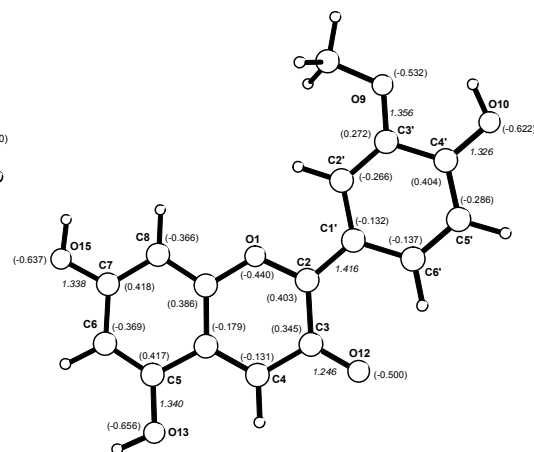
Delfinidina



Malvidina



Pelargonidina



Peonidina

Figura 11. Estructura de los radicales más estables de cada antocianina calculados por B3LYP/6-31G(d,p)

Uno de los factores que influyen en la estabilidad y deslocalización electrónica dentro de una estructura primaria, o su radical, es el enlace de puente de hidrógeno. Es decir, la reactividad localizada en el OH unido al C₃ se ve superada en las antocianinas donde existen grupos OH en posición *orto*, tal es el caso de la aurantinidina, cianidina y delfinidina.

En el caso de la aurantinidina y la delfinidina, se observa que sus radicales más estables se favorecen debido a la formación de dos puentes de hidrógeno; mientras que en la cianidina el radical más estable sólo cuenta con un puente de hidrógeno. Estas interacciones propician que el sitio más reactivo no sea el OH en el C₃, sino en otras posiciones. En la **Figura 12** se observa que las longitudes de enlace de los dos puentes de hidrógeno en la aurantinidina son de 2.14 y 2.18 Å, mientras que para la delfinidina ambos son de 2.16 Å. El único enlace de hidrógeno existente en el radical de la cianidina (electrón desapareado sobre O₁₀), tiene una longitud de 2.03 Å.

Las estructuras radicales de la malvidina, pelargonidina y peonidina no forman ningún puente de hidrógeno, presentan el sitio más reactivo en el OH unido al C₃ y tienen una menor estabilidad en su estructura en comparación con los radicales de la aurantinidina, cianidina y delfinidina.

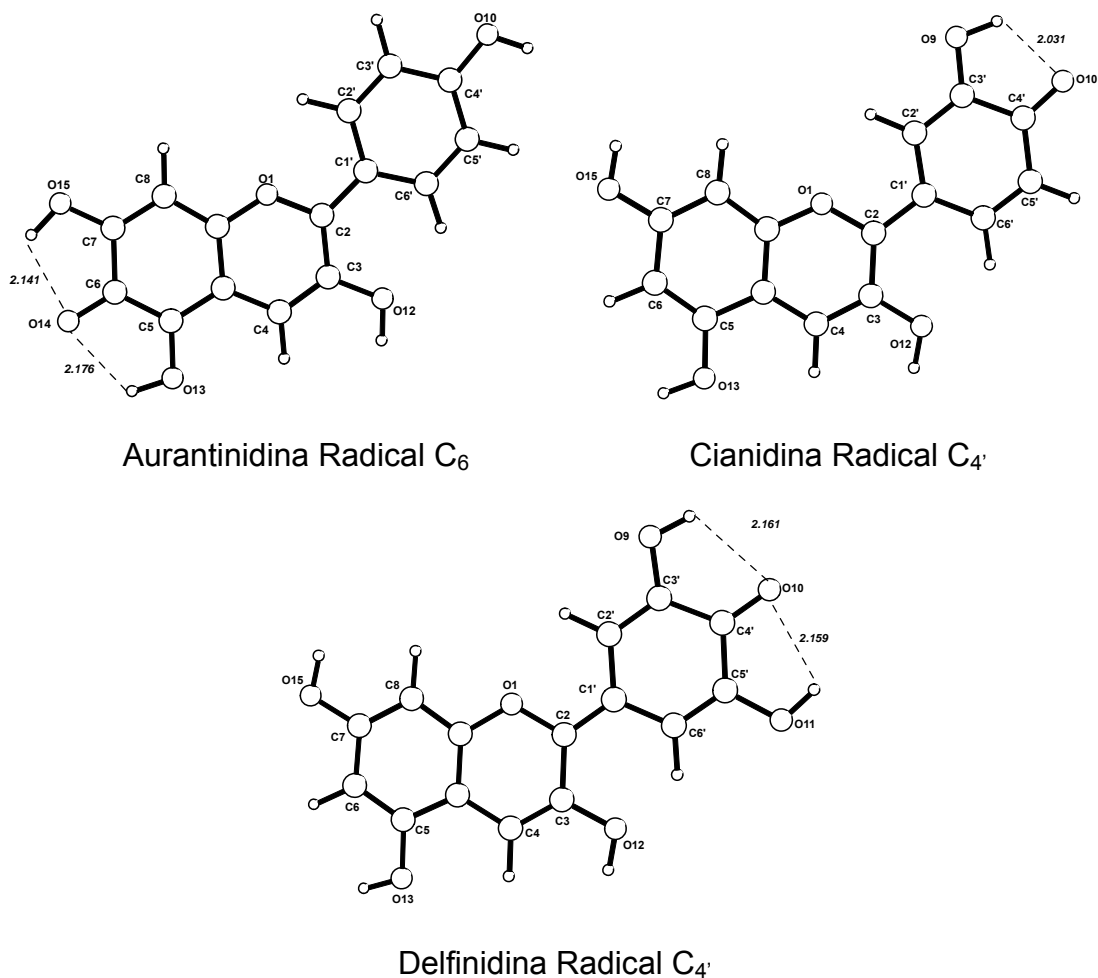


Figura 12. Estructuras estabilizadas al menos por un puente de hidrógeno

7.2.1 Análisis de longitudes de enlace de las estructuras primarias y sus radicales más estables

En los radicales más estables de la aurantinidina, cianidina y delfinidina, los puentes de hidrógeno generan que la deslocalización del electrón desapareado sea menor a través de los anillos A, B y C. Esto lo demuestra la longitud de enlace C₂-C₁' cuyos valores para las estructuras primarias son de 1.440 Å en la aurantinidina, 1.442 Å en la cianidina y 1.440

Å en la delfinidina (**Figura 10**); mientras que, para sus radicales más estables son de 1.433 Å, 1.437 Å y 1.441 Å (**Figura 11**), respectivamente. Al calcular la diferencia de las longitudes de enlace entre la estructura primaria y su radical más estable para la aurantinidina, cianidina y delfinidina se obtienen valores de 7×10^{-3} , 5×10^{-3} y 1×10^{-3} Å, respectivamente. Estos valores son menores respecto a los datos obtenidos para la malvidina, pelargonidina y peonidina, (estructuras que no presentan enlaces de hidrógeno), cuya diferencia es de aproximadamente 0.020 Å (**Tabla 4**).

Lo anterior sugiere que entre menor sea la diferencia entre las longitudes de enlace de la estructura primaria y su radical más estable, el flujo electrónico es menor a través de $C_2-C_{1'}$ en la estructura de las antocianinas. Por lo tanto, la deslocalización electrónica en aurantinidina, cianidina y delfinidina es menor que en las estructuras de malvidina, pelargonidina y peonidina. En el caso de la malvidina y peonidina, esta mínima deslocalización se debe a la presencia de los grupos metoxilo en el anillo B.

Tabla 4. Diferencias en las distancias de enlace de $C_2-C_{1'}$ para las antocianinas y sus radicales más estables (Å)

Antocianina	Estructura Primaria	Radical más estable	Diferencia
Aurantidina	1.440	1.433	0.007
Cianidina	1.442	1.437	0.005
Delfinidina	1.440	1.441	0.001
Malvidina	1.437	1.419	0.018
Pelargonidina	1.439	1.419	0.020
Peonidina	1.435	1.416	0.019

Si bien la longitud del enlace $C_2-C_{1'}$ permite explicar la resonancia entre los anillos B y C, también es importante considerar el flujo electrónico en los radicales más estables que va del oxígeno al carbono y hacia el anillo más cercano.

Tabla 5. Diferencias en las distancias de enlace (C-O) para las antocianinas y sus radicales más estables (Å)

Antocianina	Enlace	Estructura Primaria	Radical más estable	Diferencia
Aurantidinina	C_6-O_{14}	1.357	1.255	0.102
Cianidina	$C_{4'}-O_{10}$	1.351	1.238	0.113
Delfinidina	$C_{4'}-O_{10}$	1.346	1.242	0.104
Malvidina	C_3-O_{12}	1.358	1.248	0.110
Pelargonidina	C_3-O_{12}	1.355	1.247	0.108
Peonidina	C_3-O_{12}	1.355	1.246	0.109

Por ejemplo, en la aurantidinina el radical más estable se forma en el O_{14} . Al comparar la longitud de este enlace en la estructura primaria con su radical más estable, se observa una diferencia entre ambas de 0.102 Å (**Tabla 5**), lo que indica que el átomo de O_{14} está donando densidad electrónica hacia el anillo A. En la pelargonidina, la diferencia en las distancias de enlace entre la estructura primaria y su radical es de 0.108 Å para el enlace C_3-O_{12} . En cuanto a la cianidina, el flujo electrónico se presenta hacia el anillo B a través del enlace $C_{4'}-O_{10}$ con una diferencia entre la estructura primaria y su radical de 0.113 Å (**Tabla 5**).

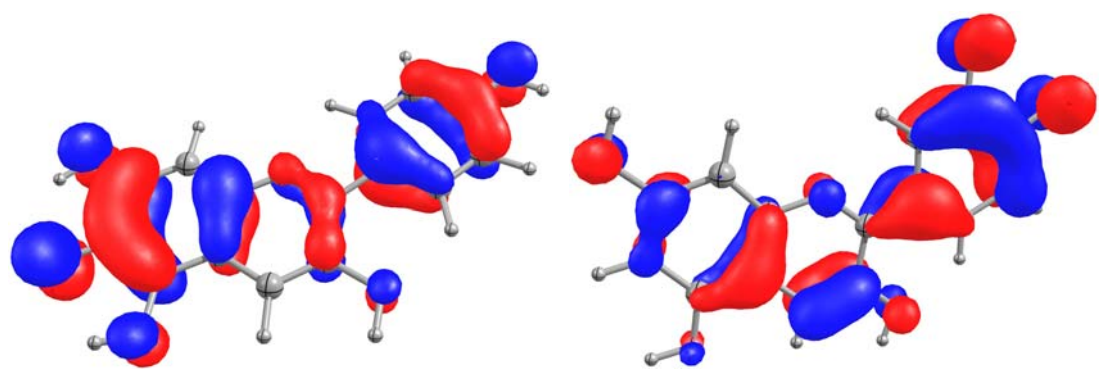
Algo interesante que se puede observar entre la delfinidina y la aurantidinina, es que ambas presentan dos enlaces de hidrógeno en posición *orto*, pero el flujo de electrones hacia los anillos aromáticos es

diferente. La delphinidina tiene una longitud de enlace $C_2-C_{1'}$ de 1.440 Å, y los grupos OH en las posiciones $C_{3'}$ y $C_{5'}$ tienen la misma contribución electrónica debido a que el anillo B es simétrico. Esto se corrobora con las longitudes de enlace entre $C_{3'-C_{4'}}$ y $C_{4'-C_{5'}}$ que son de 1.470 Å. Mientras que, en el caso de la aurantinidina el radical se genera en el anillo A haciendo que sus grupos OH en posiciones C_5 y C_7 tengan diferente contribución electrónica hacia el anillo A; así lo demuestran las longitudes de enlace C_5-C_6 y C_6-C_7 de 1.440 y 1.470 Å, respectivamente.

En suma, en base a las distancias de enlace $C_2-C_{1'}$ (**Tabla 4**) que se han mencionado se puede predecir que el flujo de electrones va desde el anillo B al C en la delphinidina y del anillo A al C en la aurantinidina (**Figura 13**).

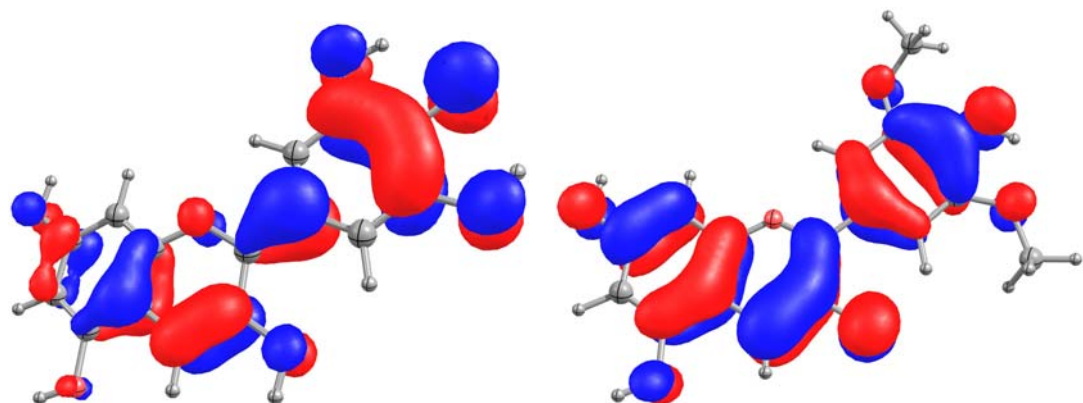
En la **Figura 13** se indican los lugares donde existe mayor probabilidad de hallar un electrón, es decir, se muestra la distribución de la densidad electrónica generada por el electrón desapareado (SOMO) de los radicales más estables para cada antocianina, donde se puede observar el efecto de la eliminación de un átomo de hidrógeno, que podría ser por alguna especie reactiva de oxígeno, es decir, la forma en que el electrón desapareado se estabiliza.

En cuanto a longitudes de enlace, en general se observa que entre menor sea la distancia del enlace del radical más estable con respecto a su estructura primaria, habrá una mayor deslocalización electrónica.



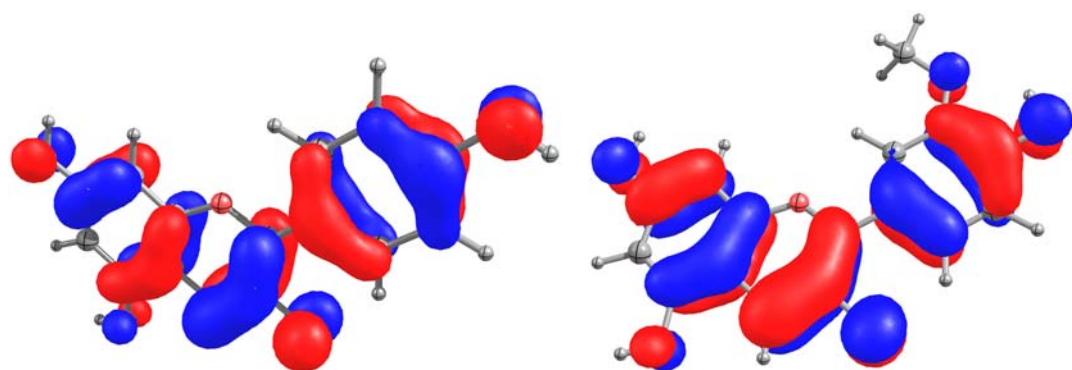
Aurantidina

Cianidina



Delphinidina

Malvidina



Pelargonidina

Peonidina

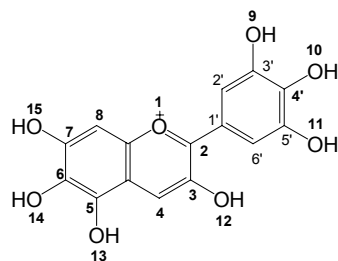


Figura 13. Orbitales SOMO de las estructuras radicales más estables

7.2.2 Análisis de las diferencias de energías entre estructuras primarias y sus radicales

En la **Tabla 6**, se muestran las energías calculadas por Gaussian 03 para cada radical generado a partir de su estructura primaria. La energía está expresada en Hartrees, pero por conveniencia se maneja en kcal/mol; para lo cual, sólo se multiplica la energía en Hartrees por un factor de 627.5.

Las diferencias de energía (ΔE) obtenidas para cada antocianina se muestran en la **Tabla 6**, y su valor se calcula restando la energía del radical a la energía de la estructura primaria. Esta diferencia permite predecir cuál es el radical más estable para cada compuesto. Por ejemplo, en el caso de la aurantinidina, la estructura del radical libre localizado en el grupo hidroxilo unido al C₃ tiene una energía de -1028.483082 Hartrees; este valor se resta al valor de la energía calculada para la molécula primaria que es de -1029.113383 Hartrees. La diferencia de energía es $\Delta E = 0.630301$ Hartrees (395.51 kcal/mol). Para este caso en especial se observa que no es el radical más estable, pues el radical con menor energía corresponde al grupo OH en la posición C₆.

Tabla 6. Energías calculadas para las antocianinas primarias (UHF/B3LYP/6-31G(d,p)) y sus respectivos radicales (RHF/B3LYP/6-31G(d,p))

	E_{elec} (Hartrees)	E_0 (Hartrees)	ΔE =Hartrees (kcal/mol)
<u>Aurantidinina</u>	-1029.351304	-1029.113383	
Radical C ₃ OH	-1028.707656	-1028.483082	0.630301 (395.51)
Radical C ₅ OH	-1028.718447	-1028.492612	0.620771 (389.53)
Radical C ₆ OH	-1028.722322	-1028.496009	0.617374 (387.40)
Radical C ₇ OH	-1028.710111	-1028.484652	0.628731 (394.53)
Radical C ₄ OH	-1028.694548	-1028.470231	0.643152 (403.58)
<u>Cianidinina</u>	-1029.351109	-1029.113056	
Radical C ₃ OH	-1028.705358	-1028.480479	0.632567 (396.94)
Radical C ₅ OH	-1028.702633	-1028.478082	0.634974 (398.45)
Radical C ₇ OH	-1028.696008	-1028.471493	0.641563 (402.58)
Radical C ₃ OH	-1028.710602	-1028.484943	0.628113 (394.14)
Radical C ₄ OH	-1028.712518	-1028.486732	0.626324 (393.02)
<u>Delfinidinina</u>	-1104.572138	-1104.330112	
Radical C ₃ OH	-1103.934826	-1103.705203	0.624909 (392.13)
Radical C ₅ OH	-1103.920975	-1103.692704	0.637408 (399.97)
Radical C ₇ OH	-1103.917450	-1103.688958	0.641154 (402.32)
Radical C ₃ OH	-1103.929506	-1103.699850	0.630262 (395.49)
Radical C ₄ OH	-1103.943659	-1103.713227	0.616885 (387.10)
Radical C ₅ OH	-1103.930299	-1103.700655	0.629457 (394.98)
<u>Malvidina</u>	-1183.177569	-1182.878888	
Radical C ₃ OH	-1182.541482	-1182.255331	0.623557 (391.28)
Radical C ₄ OH	-1182.537912	-1182.251951	0.626937 (393.40)
Radical C ₅ OH	-1182.527061	-1182.242208	0.636680 (399.52)
Radical C ₇ OH	-1182.524231	-1182.239131	0.639757 (401.45)
<u>Pelargonidinina</u>	-954.129996	-953.896003	
Radical C ₃ OH	-953.490541	-953.269117	0.626886 (393.37)
Radical C ₅ OH	-953.478379	-953.258116	0.637887 (400.27)
Radical C ₇ OH	-953.474786	-953.254287	0.641716 (402.68)
Radical C ₄ OH	-953.472713	-953.252296	0.643707 (403.93)
<u>Peonidinina</u>	-1068.658597	-1068.392047	
Radical C ₃ OH	-1068.020042	-1067.766056	0.625991 (392.81)
Radical C ₅ OH	-1068.011263	-1067.758154	0.633893 (397.77)
Radical C ₇ OH	-1068.005901	-1067.752787	0.639260 (401.14)
Radical C ₄ OH	-1068.005651	-1067.752328	0.639719 (401.42)

Como ya se ha mencionado, para las estructuras radicales de malvidina, pelargonidinina y peonidinina, se observa que las diferencias de energías más bajas se encuentran cuando el hidrógeno eliminado se encuentra unido al oxígeno del C₃ con una $\Delta E = 391.28, 393.37$ y 392.81

kcal/mol, respectivamente (**Tabla 6**). Por otra parte, los radicales más estables para las antocianinas corresponden a las estructuras donde el O[•] está unido al C₆ en aurantinidina ($\Delta E = 387.40$ kcal/mol), C_{4'} en cianidina ($\Delta E = 393.02$ kcal/mol) y C₄ en delphinidina ($\Delta E = 387.10$ kcal/mol).

7.3 Cálculo de entalpías de disociación de enlace

Para visualizar por qué un compuesto reacciona rápida o lentamente con un radical libre se considera el siguiente ejemplo, en donde se tienen tres sistemas: tocoferoles, compuestos polifenólicos y agua, cuyos valores de entalpía de disociación de enlace son 77, 88³¹ y 119 kcal/mol,⁵⁸ respectivamente. Considerando esos valores, un radical libre atacará primero a los tocoferoles para estabilizarse, posteriormente a los compuestos fenólicos y finalmente, el agua; esto se debe al requerimiento energético (menor energía) para arrancar un hidrógeno de la estructura.

Con la finalidad de determinar en base al mecanismo de transferencia de hidrógeno (**Reacción 8**), la capacidad de las antocianinas para atrapar un radical libre se calculan las entalpías de disociación de enlace (EDE) (**Tabla 7**) empleando el método B3LYP/6-31G(d,p), mediante la fórmula de reactivos – productos (**Reacción 8**).



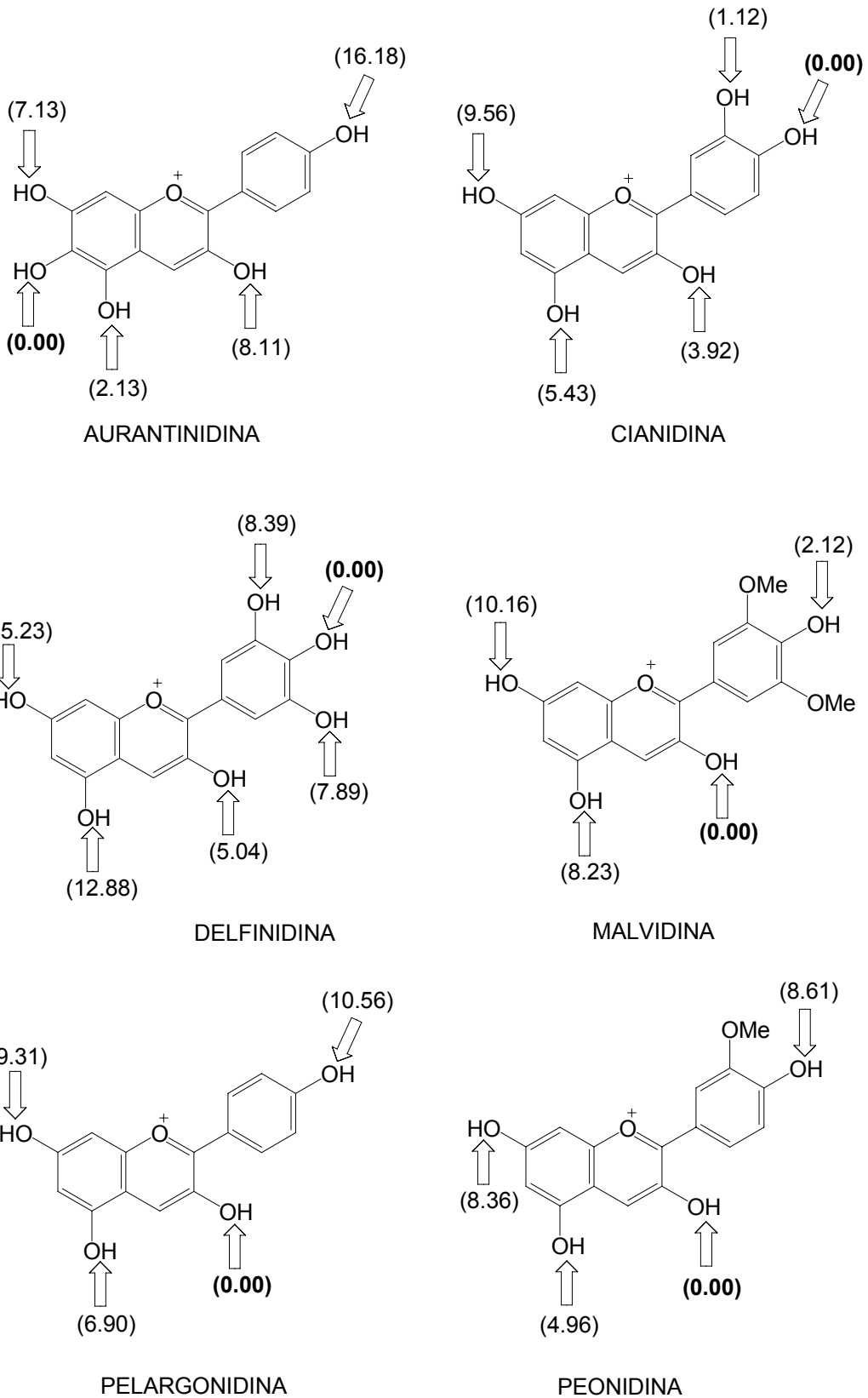
Donde los términos ArOH y ArO[•] se utilizan para referirse a la estructura primaria de las antocianinas y su correspondiente radical, respectivamente.

El valor de la energía de disociación de enlace para el átomo de hidrógeno (H•) calculado al mismo nivel de teoría que las antocianinas y sus radicales [B3LYP/6-31G(d,p)], es de -0.5002730 Hartrees (-313.92 kcal/mol).

En la **Tabla 7** se muestran los valores de EDE obtenidos para la estructura primaria de las antocianinas y sus radicales, en donde se observa que los valores más pequeños para cada estructura radical están comprendidos entre 73.17 kcal/mol (delfinidina) y 79.45 kcal/mol (pelargonidina). A simple vista se podría concluir que la delfinidina es la que presenta mayor capacidad de captura de radicales libres y la pelargonidina una menor capacidad. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el método ORAC en cuanto a la actividad antioxidante de las antocianinas (**Tabla 3**) indican que la cianidina presenta la mayor actividad seguida de la malvidina, delfinidina, peonidina y por último la pelargonidina. Estos resultados aparentemente opuestos se explican cuando se hace un análisis más profundo de los datos obtenidos en cuanto a la EDE. Por ejemplo, aunque la delfinidina tiene seis grupos hidroxilo en su estructura y la cianidina sólo cinco, tiene menor capacidad antioxidante que esta última (**Figura 14**). Para poder entender este comportamiento se han calculado valores relativos de entalpía de disociación de enlace para cada antocianina, con lo que se ilustra lo que ocurre a nivel estructural. El valor de EDE relativa se ha determinado para los radicales de cada antocianina como la diferencia entre el menor valor de EDE y los otros radicales de la misma estructura.

Tabla 7. EDE para antocianinas

Radical	EDE (Hartrees)	EDE (kcal/mol)
<u>Aurantidina</u>		
Radical C ₃ OH	0.1300282	81.59
Radical C ₅ OH	0.1204982	75.61
Radical C ₆ OH	0.1171012	73.48
Radical C ₇ OH	0.1284582	80.61
Radical C _{4'} OH	0.1428792	89.66
<u>Cianidina</u>		
Radical C ₃ OH	0.1323042	83.02
Radical C ₅ OH	0.1347012	84.53
Radical C ₇ OH	0.1412902	88.66
Radical C _{3'} OH	0.1278402	80.22
Radical C _{4'} OH	0.1260512	79.10
<u>Delfinidina</u>		
Radical C ₃ OH	0.1246362	78.21
Radical C ₅ OH	0.1371352	86.05
Radical C ₇ OH	0.1408812	88.40
Radical C _{3'} OH	0.1299892	81.57
Radical C _{4'} OH	0.1166122	73.17
Radical C _{5'} OH	0.1291842	81.06
<u>Malvidina</u>		
Radical C ₃ OH	0.1232842	77.36
Radical C ₅ OH	0.1364072	85.60
Radical C ₇ OH	0.1394842	87.53
Radical C _{4'} OH	0.1266642	79.48
<u>Pelargonidina</u>		
Radical C ₃ OH	0.1266132	79.45
Radical C ₅ OH	0.1376142	86.35
Radical C ₇ OH	0.1414432	88.76
Radical C _{4'} OH	0.1434342	90.00
<u>Peonidina</u>		
Radical C ₃ OH	0.1257182	78.89
Radical C ₅ OH	0.1336202	83.85
Radical C ₇ OH	0.1389872	87.21
Radical C _{4'} OH	0.1394462	87.50



NOTA. Los números entre paréntesis son entalpías relativas (kcal/mol).

Figura 14. Sitios de ataque de radicales libres en las antocianinas

Por ejemplo, en la **Figura 14** se muestran los sitios de ataque de especies reactivas de oxígeno (EROs) en la cianidina. El enlace O-H unido al C_{4'} es el sitio más probable pues tiene el valor de entalpía menor de disociación de enlace (79.10 kcal/mol) (**Tabla 7**) por lo que se le asigna el valor de 0.00 kcal/mol. El grupo hidroxilo unido al C_{3'} es el segundo sitio probable con un $\Delta E = 1.12$ kcal/mol (80.22 -79.10 kcal/mol) y el tercer sitio probable es el grupo hidroxilo en el C₃ con 3.92 kcal/mol de diferencia. En el caso de la delphinidina, el primer sitio probable está en la posición C_{4'} con un valor de EDE de 73.17 kcal/mol (EDE relativa = 0.00 kcal/mol); el segundo sitio más probable (C₃) está a una $\Delta E = 5.04$ kcal/mol, y el tercero (C₅) a 7.89 kcal/mol. Con base en los datos anteriores, la cianidina tiene más probabilidad de ser atacada por radicales libres porque presenta más sitios con bajas energías de disociación de enlace O-H que la delphinidina, lo cual coincide con los datos reportados por Wang y col. (1997).¹⁷

Este mismo comportamiento se observa con el resto de las antocianinas (**Figura 14**). La estructura que presenta mejor actividad antioxidante después de la cianidina es la malvidina, pues la diferencia entre el primer sitio probable de ataque (C₃) y el segundo (C_{4'}) es de sólo $\Delta E = 2.12$ kcal/mol. El tercer sitio (C₅) presenta $\Delta E = 8.23$ kcal/mol.

En el caso de la delphinidina y la peonidina, la diferencia entre el primer sitio y el segundo es aproximadamente de 5 kcal/mol para ambas (**Figura 14**), (la diferencia entre 5.04 para delphinidina y 4.96 para peonidina es de 0.08 kcal/mol, un valor pequeño y despreciable en términos de energía). Por lo tanto, para poder determinar cuál de estas dos antocianinas tiene mayor

capacidad antioxidante se calcula el valor de EDE relativa para el tercer sitio probable, en este caso, el grupo hidroxilo en C₅ (7.89 kcal/mol) y C₇ (8.36 kcal/mol) para delphinidina y peonidina, respectivamente. Al estimar la diferencia entre la EDE relativa del tercero y segundo sitio más probables se obtuvieron los siguientes valores: $\Delta E = 2.85$ (7.89–5.04 kcal/mol) y $\Delta E = 3.37$ (8.36–4.96 kcal/mol) para la delphinidina y peonidina, respectivamente (**Tabla 8**). Los resultados así obtenidos indican que la delphinidina tiene mayor posibilidad que la peonidina de ser atacada por radicales libres debido a que existe una menor diferencia de energías relativas entre sus grupos OH; por lo tanto, tiene mayor capacidad antioxidante.

Finalmente, la pelargonidina tiene la menor capacidad antioxidante y ocupa el último lugar, debido a que la diferencia entre el grupo hidroxilo (C₃) con menor energía y el siguiente (C₅) es de 6.90 kcal/mol. Estos valores se pueden observar en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Orden de reactividad de acuerdo a las diferencias de EDE (kcal/mol)

Antocianina	1 ^a Diferencia de EDE	2 ^a Diferencia de EDE	Orden
Cianidina	1.12		1
Aurantidinidina	2.13	4.99	2
Malvidina	2.12	6.11	3
Delphinidina	5.04	2.85	4
Peonidina	4.96	3.37	5
Pelargonidina	6.90		6

Por otra parte, aunque no existen datos reportados en la literatura acerca de la capacidad antioxidante de la aurantinidina, con base en sus propiedades electrónicas es posible predecir dicha actividad respecto a las

antocianinas estudiadas en este trabajo. En la aurantinidina, el radical más estable se forma al quitar el hidrógeno unido al O₁₄ en la posición C₆, por lo que se le asigna el valor de EDE relativa de 0.00 kcal/mol. La diferencia más cercana está en el C₅ con un $\Delta E = 2.13$ kcal/mol; este valor es casi igual al de la malvidina, pero a diferencia de ésta el siguiente grupo hidroxilo de la aurantinidina tiene un valor de EDE relativa = 7.13 kcal/mol que es 1.1 kcal/mol menor que el tercer sitio en el caso de la malvidina (8.23 kcal/mol). Con base en estos resultados teóricos obtenidos, se puede predecir que la aurantinidina tendrá una mayor capacidad antioxidante que la malvidina.

De esta manera la predicción de reactividad de las antocianinas estudiadas teóricamente por el método B3LYP/6-31G(d,p) presenta el siguiente orden: cianidina > aurantinidina > malvidina > delphinidina > peonidina > pelargonidina (**Tabla 7**), cuyos sitios más reactivos son el C_{4'} para la cianidina y delphinidina, C₆ para la aurantinidina y C₃ para malvidina, peonidina y pelargonidina.

Una vez localizados los sitios más reactivos en las seis estructuras de antocianinas, se observa que el grupo C_{3'}-OMe en posición *orto* a un grupo C_{4'}-OH (**Figura 11**), tal como la peonidina, poco influye en la reactividad debido a que al formarse el radical C_{3'}-O• no se encuentra estabilizado por algún puente de hidrógeno y el poder electro-atractor de un grupo -OMe en ésta posición es mínimo. En contraste, si existen dos grupos -OMe posicionados *orto* al radical C_{3'}-O•, como en el caso de la malvidina, favorecen al incremento en el carácter electro-atractor de estos grupos. Lo anterior se demuestra por las cargas puntuales de los carbonos en posición

orto (donde se encuentran estos grupos -OMe) al radical libre formado en la posición C₄'. Los valores de las cargas son todas positivas y son +0.365 para C3' para la peonidina, y +0.330 y +0.334, para C3' y C5' respectivamente, para la malvidina. Cabe mencionar que cuando solo existen hidrógenos o grupos OH en estas posiciones los valores de los carbonos son negativos.

7.4 Correlación entre la actividad antioxidante de las antocianinas evaluada por el método ORAC y EDEs relativas

Las EDEs relativas correlacionan de manera acertada con los datos experimentales de actividad antioxidante de Wang y col (1997).¹⁷ Esto es de comprenderse, ya que las EDEs relativas permiten explicar la primera parte del concepto de un buen antioxidante; “el antioxidante debe reaccionar rápidamente con el radical” (**reacción 4**). Por otro lado, según el análisis electrónico del radical cianidina C₄'-O·, este podría estar mejor estabilizado debido a la corta distancia del puente de hidrógeno entre el radical O· y el H-OC₃' (2.03 Å); y esta estabilidad explicaría una reacción lenta con el sustrato, que es la otra parte del concepto de un buen antioxidante, de ahí que la cianidina presenta la mayor capacidad antioxidante de todas las antocianinas evaluadas en el presente trabajo y esto está de acuerdo a lo reportado por Wang y col. (1997).¹⁷

Así mismo, los resultados obtenidos teóricamente coinciden con los resultados experimentales publicados, lo cual se puede observar al graficar la actividad antioxidante evaluada mediante el método de ORAC por Wang y col. (1997),¹⁷ (**Tabla 3**) contra los datos de EDE obtenidos teóricamente

(Tabla 8, columna 2), en donde se aprecia que existe una correlación lineal entre estos datos (Figura 15). Así mismo, la gráfica indica que el valor de ORAC para cada antocianina (excluyendo a la aurantinidina) es inversamente proporcional a la primera diferencia de EDE.

Por otra parte, en base a los datos obtenidos se puede decir que B3LYP/6-31G(d,p) es un buen método para evaluar la actividad antioxidante de las antocianinas. Cabe señalar que este método evaluó el mecanismo de transferencia de hidrógeno. Los resultados teóricos así obtenidos tienen una buena correlación con los datos experimentales reportados por Huang y col. (2005)²⁹, cuya $R^2=0.97$.

Por último, la correlación lineal de los datos teóricos con los experimentales sugieren que el método (B3LYP/6-31G(d,p)) permite predecir las propiedades antioxidantes de las antocianinas.

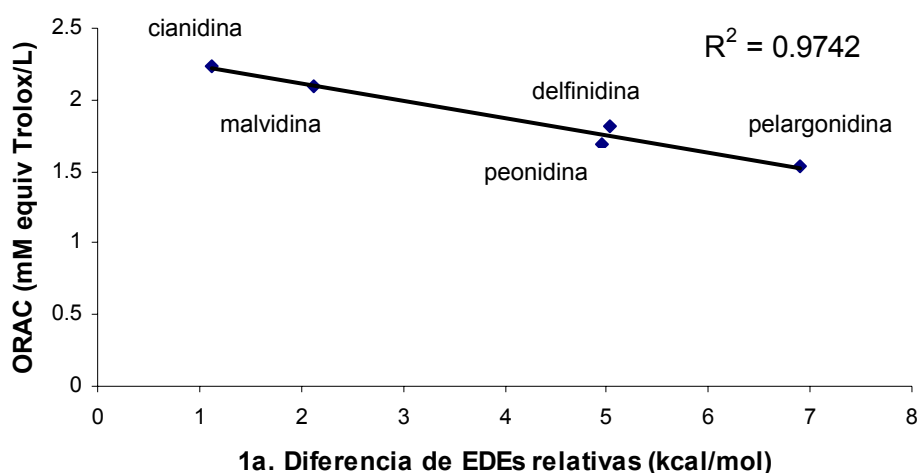


Figura 15. Gráfica que representa la relación directa entre ORAC y EDEs relativas

8. CONCLUSIONES

- La geometría plana de las moléculas juega un papel importante en la estabilización del radical, permitiendo así el flujo electrónico a través de los anillo A y C, y B.

- Un factor estructural importante para la estabilización de los radicales de las antocianinas es la presencia de puentes de hidrógeno.

- En cuanto a su reactividad, el sitio más reactivo de la aurantinidina corresponde al grupo OH unido al C₆; mientras que para la cianidina y delphinidina la posición más reactiva se encuentra en los grupos OH unidos al C₄. En el caso de la malvidina, pelargonidina y peonidina, el sitio más reactivo es el grupo hidroxilo que se encuentra unido al C₃ debido a que estas antocianinas no presentan enlaces de hidrógeno en las estructuras radicales.

- La reactividad de las antocianinas no sólo depende del número y posición de OH en la estructura, sino también de las diferencias en las entalpías de disociación del enlace O-H entre todos los posibles radicales generados.

- La cianidina, a pesar de tener un grupo OH menos que la delphinidina, presenta mayor actividad antioxidante, y esto se atribuye a que las diferencia de EDEs relativas de sus radicales son menores que en los radicales de la delphinidina. Este comportamiento también se puede observar al comparar la delphinidina con la aurantinidina.

- En suma, el método B3LYP/6-31G(d,p) indica que la actividad antioxidante de las antocianinas presenta el siguiente orden: cianidina > aurantinidina > malvidina > delphinidina > peonidina > pelargonidina.

- Los datos obtenidos mediante B3LYP/6-31G(d,p) indican que las EDEs relativas de los radicales son un buen parámetro estructural para evaluar la capacidad antioxidante de las antocianinas mediante el mecanismo de transferencia de hidrogeno y concuerda con los datos experimentales obtenidos mediante ORAC.

- El mayor acortamiento del enlace C₂-C_{1'} en los radicales, respecto a sus estructuras primarias, indica que existe un mayor flujo electrónico a través de este enlace desde el anillo C al B o viceversa. Esto se corrobora con la distribución de la densidad electrónica en los orbitales SOMO.

9. PERSPECTIVAS

Actualmente no hay estudios que relacionen la estructura química de las antocianinas con su capacidad antioxidante. Por ello, el presente trabajo puede ser una base para realizar estudios de esta naturaleza. Por ejemplo, se podrían llevar a cabo estudios en glicósidos de antocianinas, que podrían ayudar a determinar el efecto de los fragmentos de azúcares sobre la capacidad antioxidante de estos compuestos.

Además, realizar una investigación enfocada a los cambios estructurales, propiedades y características en las antocianinas cuando se encuentran en diferentes condiciones de pH.

En un futuro, este conocimiento permitirá llevar a cabo predicciones del comportamiento de estructuras con potencial actividad antioxidante que conducirá a la elaboración de buenos antioxidantes para la industria alimentaria.

10. REFERENCIAS

1. González, S. J.; Muñiz, R.; Valls, B., *Centro de Información Cerveza y Salud* 2001, p 1.
2. Pineda-Alonso, D.; Salucci, M.; Lázaro, R.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A., *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* **1999**, 13, 104.
3. Martínez-Flores, S.; González-Gallego, J. J. M.; Culebras, J. J. M.; Tuñón, M. J., *Nutr. Hosp.* **2002**, XVII, 271.
4. Aldrick, A.; Flynn, J.; Rowland, I., *Mut. Res.* **1986**, 163, 225.
5. Kawai, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 896.
6. Russo, A.; Acquaviva, R.; Campisi, A.; Sorrentini, V.; Di-Giacomo, C., *Cell Biol. Toxicol.* **2000**, 63, 896.
7. Hirono, I., *Biol. Pharm. Bull.* **1987**, 2, 120.
8. Morel, I.; Lescoat, G.; Gogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P., *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 45, 13.
9. Pérez, G., *Rev. Cub. Inv. Biomed.* **2003**, 22, 48.
10. Sakihama, Y.; Cohem, M.; Grace, S.; Yamasaki, H., *Toxicology* **2002**, 177, 67.
11. Vaya, J.; Mahmood, S.; Goldblum, A.; Aviram, M.; Volkova, N.; Salan, A.; Musa, M.; Tamir, S., *Phytochemistry* **2003**, 62, 89.
12. Pietta, P., *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035.
13. Francis, F. J., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, 16, 556.

14. Strack, D.; Wray, V. *The Anthocyanins, The flavonoids: Advances in research since 1986*; J. B. Hairbone Ed.; Chapman & Hall: London, U.K, **1993**, pp. 1-19.
15. Terahara, N.; Yamaguchi, M.; Honda, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, 58, 1324.
16. Timberlake, C. F.; Henry, B. S., *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, 280, 107.
17. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R., *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 304.
18. Scharrer, A.; Ober, M., *Klin. Monatsbl. Augenheikd.* **1981**, 178, 386.
19. Mian, E.; Curri, S. B.; Lietti, A.; Bombardelli, E., *Minerva Med.* **1977**, 68, 565.
20. Kamei, H.; Kojima, T.; Hasegawa, M.; Koide, T.; Umeda, T.; Yukawa, T.; Terabe, K., *Cancer Invest.* **1995**, 13, 590.
21. Akhmadieva, A. K.; Zaichkina, S. I.; Ruzieva, R. K.; Ganassi, E. E., *Radiobiología* **1993**, 33, 433.
22. Minkova, M.; Drenska, D.; Pantev, T.; Ovcharov, R., *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* **1990**, 68, 3565.
23. Colantuoni, A.; Bertuglia, S.; Magistretti, M. J.; Donato, L., *Arzneim.-Forsch.* **1991**, 41, 905.
24. Lietti, A.; Cristoni, A.; Picci, M., *Arzneim.-Forsch.* **1976**, 26, 829.
25. Jayaprakasam, B.; Vareed, S. K.; Olson, L. K.; Nair, M. G., *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 28.
26. Marais, J.P.J.; Deavours, B.; Dixon, R.A; Ferreira, D. *The Stereochemistry of Flavonoids, The Science of Flavonoids*; Grotewold, E. Ed.; Springer: Columbus Ohio, USA, **2006**, pp. 1-46.

27. He, J., *Absorption, excretion, and transformation of individual anthocyanins in rats*; Thesis of master degree; Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, 2004, pp. 5,14-16.
28. Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4069.
29. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L., *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841.
30. Pedulli, B. F.; Lucarini, M.; Pedrielli, P., *Free radicals in biology and Enviroment; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.* **1997**.
31. Wright, J. S.; Johnson, E. R.; Dilabio, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1173.
32. Avello, M.; Pastene, E., *BLACPMA* **2005**, 4, 33.
33. Lewars, E., *Computational Chemistry*; Kluwer Academic Publishers: Ontario, Canada, **2003**, pp. 9-64
34. Foresman, J. B. F., *Æ. Exploring chemistry with electronic structure methods*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, **1996**.
35. Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N., *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3232.
36. Van Acker, S. A. B. E.; De Groot, M. J.; Van der Berg, D. J.; Tromp, M. N. J. L.; Den Kelder, G. D. O.; Van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 1305.
37. Bors, W.; Heller, W.; Saran, M., *Methods in enzymology*; Academic Press: San Diego. **1990**.

38. Trouillas, P.; Fagnère, G.; Lazzaroni, R.; Calliste, C.; Marfak, A.; Duroux, J.-L., *Food Chem.* **2004**, 88, 571.
39. Bendz, G.; Mårtensson, O.; Nilsson, E., *Ark. Kemi* **1967**, 24, 2255.
40. Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, N.; Dangles, O.; Brouillard, R., *Phytochemistry* **1995**, 41, 301.
41. Kurtin, W. E.; Song, P.-S., *Tetrahedron* **1968**, 24, 2255.
42. Merlin, J.-C.; Statoua, A.; Cornard, J.-P.; Saidi-Idrissi, M.; Brouillard, R., *Phytochemistry*. **1994**, 35, 227.
43. Pereira, G. K.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E., *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1996**, 363, 87.
44. Pereira, G. K.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E., *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1997**, 392, 169.
45. Pereira, G. K.; Galembeck, S. E., *Spectrochim Acta Part A* **1998**, 54, 339.
46. Rastelli, G.; Constantino, L.; Albasini, A., *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1993**, 279, 157.
47. Torskangerpoll, K.; Børve, K. J.; Andersen, Ø. M.; Sæthre, L. J., *Spectrochim Acta Part A* **1999**, 55, 761.
48. Sakata, K.; Saito, N.; Honda, T., *Tetrahedron* **2006**, 62, 3721.
49. Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M., *J. Phys. Chem. A.* **2004**, 108, 4916.
50. HyperChem 7.52, H. I., Waterloo, Canada, 2006.
51. Frisch, M. J. Trucks., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.;

Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A. *Gaussian 03*, Revision B.05; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2004.

52. Becke, A. D., *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.
53. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785.
54. Zhurko, G. A. In *ChemCraft: for the treatment of chemical data*; 1.5 ed.; www.chemcraftprog.com <<http://www.chemcraftprog.com>>, 2006.
55. Saito, N.; Ueno, K., *Heterocycles* **1985**, 23, 2709.
56. Ueno, K.; Saito, N., *Acta Crystallogr., Sect. B* **1977**, 33, 114.
57. Modak, B.; Contreras, M. L.; González-Nilo, F.; Torres, N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 309.

58. Berkowitz, J.; Ellison, G. B.; Gutman, D. J., *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 2744.

11. APÉNDICE

11.1 Coordenadas cartesianas de las estructuras primarias

AURANTINIDINA

C	3.267713	0.841869	-0.000119
C	4.009429	-0.329696	-0.000116
C	3.358871	-1.587438	-0.000063
C	-0.956579	0.467573	0.000032
C	-0.371836	1.767405	-0.000029
C	1.004906	1.899409	-0.000072
O	3.852266	2.056237	-0.000171
O	4.209171	-2.638427	-0.000065
H	1.462743	-2.648068	0.000034
O	5.361177	-0.210238	-0.000167
H	1.455461	2.888322	-0.000115
C	-2.347203	0.094939	0.000077
C	-2.698774	-1.284995	0.000034
C	-3.401461	1.04589	0.000169
H	-1.919362	-2.035868	-0.000039
H	-3.180802	2.102028	0.000212
C	-4.013626	-1.690171	0.000073
C	-4.722732	0.639867	0.000213
C	-5.043997	-0.728356	0.000162
O	-6.303036	-1.188927	0.000196
H	-6.941121	-0.460368	0.000259
O	-1.205895	2.835068	-0.000046
O	-0.112416	-0.581788	0.000038
H	-4.281371	-2.740665	0.000038
H	-5.514962	1.383452	0.000291
H	-0.699353	3.659473	-0.000155
H	4.816842	1.943076	-0.000199
H	3.739657	-3.484028	-0.000026
H	5.76979	-1.089498	-0.000159

CIANIDINA

C	3.878928	-0.643048	-0.000248
C	4.508964	0.583417	-0.000172
C	3.746254	1.775999	0.000022
C	-0.368573	-0.660856	0.000084
C	0.32613	-1.900466	-0.000093
C	1.71245	-1.906434	-0.000196
O	4.517066	-1.830996	-0.000429
O	4.457033	2.914277	0.000084
H	1.7527	2.657956	0.000292
H	5.590706	0.667949	-0.000259
H	2.249454	-2.851017	-0.000354
C	-1.787638	-0.406671	0.000143
C	-2.240489	0.940025	-0.000264
C	-2.747324	-1.449517	0.000646
H	-1.54172	1.765311	-0.000664
H	-2.437721	-2.482336	0.00102
C	-3.588227	1.236296	-0.0002
C	-4.101855	-1.150296	0.000726
C	-4.531957	0.176983	0.000295
O	-5.823089	0.573801	0.000305
H	-6.430144	-0.179695	0.000614
O	-0.404725	-3.041304	-0.000173
O	0.379708	0.462504	0.000185
O	-3.996665	2.523094	-0.000626
H	-4.833583	-1.953271	0.001128
H	0.176162	-3.814946	-0.000596
H	5.477006	-1.707573	-0.000498
H	3.878748	3.690602	0.000216
H	-4.96606	2.550224	-0.000512

DELFINIDINA

C	-4.097949	-0.775889	0.000318
C	-4.801344	0.41032	0.000089
C	-4.11207	1.646423	-0.00023
C	0.143697	-0.537343	0.00004
C	-0.476425	-1.816432	0.000393
C	-1.859052	-1.907006	0.000475
O	-4.663984	-2.000289	0.00063
O	-4.889436	2.74049	-0.000437
H	-2.174948	2.646226	-0.000572
H	-5.886156	0.428772	0.000144
H	-2.33776	-2.882385	0.000761
C	1.543613	-0.198936	-0.000035
C	1.908107	1.171183	0.000176
C	2.560961	-1.191674	-0.000375
H	1.159867	1.950971	0.000453
H	2.309855	-2.24178	-0.000611
C	3.239996	1.548362	0.000077
C	3.888597	-0.804143	-0.000469
C	4.240629	0.55705	-0.000239
O	5.522211	0.967217	-0.000291
H	6.109572	0.193085	-0.000436
O	0.321003	-2.914401	0.000691
O	-0.672113	0.539084	-0.000184
O	3.570733	2.857532	0.000313
O	4.962193	-1.64642	-0.000864
H	4.536679	2.944394	0.000249
H	-0.216823	-3.718603	0.001083
H	-5.629556	-1.93409	0.000671
H	-4.358276	3.54983	-0.000653
H	4.684158	-2.571602	-0.000283

MALVIDINA

C	-4.53462	-0.771165	0.049857
C	-5.23341	0.416798	-0.010552
C	-4.53895	1.647033	-0.08405
C	-0.291548	-0.55448	0.006831
C	-0.919619	-1.829447	0.082604
C	-2.300982	-1.913277	0.097425
O	-5.107651	-1.990984	0.121255
O	-5.310985	2.744575	-0.140194
H	-2.597035	2.634682	-0.154182
H	-6.318097	0.43979	-0.004247
H	-2.784342	-2.884482	0.156439
C	1.107786	-0.227148	-0.021058
C	1.484915	1.136818	-0.045431
C	2.123611	-1.224301	-0.017034
H	0.741221	1.921227	-0.03685
H	1.865233	-2.269268	0.009322
C	2.814863	1.533187	-0.086879
C	3.446393	-0.833205	-0.058151
C	3.815986	0.536024	-0.114705
O	5.110994	0.865601	-0.206114
H	5.628055	0.040034	-0.209858
O	-0.126317	-2.929566	0.141463
O	-1.103545	0.52468	-0.046974
O	3.058978	2.861966	-0.177788
O	4.530875	-1.658066	-0.076863
H	-0.669105	-3.728559	0.195525
H	-6.072693	-1.918142	0.123296
H	-4.77424	3.548505	-0.190992
C	4.324023	-3.071993	-0.067024
H	3.753852	-3.388408	-0.94719
H	5.316965	-3.518971	-0.093731
H	3.805364	-3.383245	0.846161
C	4.152526	3.446985	0.555588
H	5.110208	3.242671	0.07602
H	3.954682	4.519019	0.552415
H	4.168766	3.082014	1.587636

PELARGONIDINA

C	3.598605	0.771568	-0.000084
C	4.322378	-0.402278	-0.000194
C	3.654731	-1.650024	-0.00024
C	-0.637634	0.461416	0.000095
C	-0.03939	1.751433	0.000121
C	1.341371	1.864666	0.000076
O	4.142933	2.005331	-0.000034
O	4.451018	-2.730299	-0.000347
H	1.735712	-2.683427	-0.000202
H	5.407323	-0.401964	-0.000246
H	1.803969	2.847748	0.000084
C	-2.031012	0.103821	0.000089
C	-2.397197	-1.272532	-0.000565
C	-3.074993	1.066501	0.000766
H	-1.625886	-2.031625	-0.001105
H	-2.842418	2.120064	0.001311
C	-3.716251	-1.66329	-0.000565
C	-4.400357	0.674894	0.00079
C	-4.736208	-0.690161	0.000117
O	-5.999713	-1.136926	0.00008
H	-6.630636	-0.401991	0.000567
O	-0.858577	2.831242	0.000163
O	0.194911	-0.601907	0.000016
H	-3.995225	-2.710784	-0.001094
H	-5.184511	1.426894	0.001339
H	-0.340998	3.64874	-0.000082
H	5.109625	1.956803	-0.000081
H	3.93454	-3.549073	-0.000372

PEONIDINA

C	4.093334	-0.533336	0.000673
C	4.636108	0.73522	-0.000326
C	3.791089	1.868919	-0.00155
C	-0.142923	-0.860305	-0.000165
C	0.645086	-2.047126	0.001205
C	2.025171	-1.952262	0.001499
O	4.81577	-1.672609	0.001874
O	4.417521	3.057496	-0.002499
H	1.740816	2.60533	-0.002734
H	5.70921	0.895009	-0.000221
H	2.629778	-2.854829	0.002652
C	-1.571257	-0.717296	-0.000536
C	-2.133702	0.595395	0.000992
C	-2.448962	-1.832448	-0.002677
H	-1.480415	1.455744	0.002591
H	-2.053373	-2.835337	-0.004065
C	-3.499583	0.766798	0.000578
C	-3.821298	-1.653623	-0.003281
C	-4.364072	-0.366826	-0.001625
O	-5.686929	-0.198645	-0.002042
H	-5.879744	0.755379	-0.00066
O	0.00003	-3.238777	0.002414
O	0.522954	0.317631	-0.001003
O	-4.176968	1.945302	0.002056
H	-4.497236	-2.500896	-0.005038
H	0.636798	-3.967251	0.003907
H	5.764235	-1.48	0.001931
H	3.783252	3.78843	-0.003403
C	-3.438385	3.168054	0.00446
H	-2.814515	3.247535	-0.892664
H	-4.18034	3.965394	0.005347
H	-2.815575	3.244645	0.902578

11.2 Coordenadas cartesianas de los radicales más estables

AURANTINIDINA C₆ OH

C	3.293656	0.849779	-0.000122
C	4.074808	-0.361795	-0.000122
C	3.364771	-1.646679	-0.000069
C	-0.920853	0.485439	0.000027
C	-0.340919	1.788302	-0.000023
C	1.034424	1.922933	-0.00007
O	3.933523	2.011557	-0.000169
O	4.115774	-2.734725	-0.00007
H	1.456691	-2.649384	0.00002
O	5.328995	-0.321908	-0.000166
H	1.482744	2.912728	-0.00011
C	-2.301949	0.102524	0.000073
C	-2.64392	-1.282834	0.000052
C	-3.365114	1.047874	0.000144
H	-1.859688	-2.028482	-0.000003
H	-3.150915	2.105292	0.000166
C	-3.954445	-1.696202	0.000095
C	-4.681521	0.632867	0.00019
C	-4.99232	-0.739846	0.000165
O	-6.244532	-1.208866	0.000204
H	-6.892119	-0.488083	0.00025
O	-1.18069	2.849836	-0.000024
O	-0.066149	-0.565046	0.000026
H	-4.21541	-2.748296	0.000075
H	-5.479591	1.369949	0.000247
H	-0.682568	3.679646	-0.000091
H	4.893316	1.81052	-0.000198
H	5.051993	-2.444444	-0.000109

CIANIDINA C₄' OH

C	3.835534	-0.657131	-0.000197
C	4.475832	0.562246	-0.00015
C	3.721182	1.761969	-0.000022
C	-0.418239	-0.641702	0.000058
C	0.268528	-1.884119	-0.000089
C	1.661708	-1.899142	-0.000166
O	4.457167	-1.85127	-0.000317
O	4.440655	2.890377	0.000015
H	1.736705	2.665211	0.000162
H	5.557995	0.638847	-0.000208
H	2.190891	-2.847874	-0.000286
C	-1.830198	-0.372398	0.00012
C	-2.259112	0.975885	-0.000183
C	-2.814929	-1.440034	0.000538
H	-1.551204	1.79309	-0.000497
H	-2.477046	-2.464355	0.000813
C	-3.610217	1.260603	-0.000118
C	-4.1498	-1.178847	0.000628
C	-4.636999	0.187455	0.000291
O	-5.825633	0.535266	0.000319
O	-0.454884	-3.023091	-0.000185
O	0.342236	0.484114	0.000098
O	-4.072977	2.497958	-0.000425
H	-4.886679	-1.974324	0.000964
H	0.12369	-3.799235	-0.000406
H	5.419492	-1.744351	-0.000364
H	3.873716	3.675718	0.000107
H	-5.054683	2.415899	-0.000303

DELFINIDINA C₄' OH

C	-4.058934	-0.78055	0.000336
C	-4.763274	0.402958	0.000172
C	-4.074187	1.641634	-0.000084
C	0.18639	-0.536075	0.000048
C	-0.430904	-1.813828	0.000315
C	-1.821309	-1.904398	0.000409
O	-4.61656	-2.006214	0.000581
O	-4.853592	2.730047	-0.000229
H	-2.140836	2.649213	-0.000379
H	-5.848002	0.421361	0.000233
H	-2.298302	-2.88043	0.000624
C	1.586352	-0.193288	-0.000057
C	1.932394	1.196525	0.000031
C	2.59455	-1.201774	-0.000276
H	1.167038	1.958928	0.000203
H	2.344498	-2.250038	-0.00037
C	3.248996	1.578204	-0.000069
C	3.921383	-0.835483	-0.000394
C	4.318778	0.574876	-0.000283
O	5.515709	0.907803	-0.000393
O	0.354044	-2.910876	0.000496
O	-0.632834	0.545752	-0.0001
O	3.627689	2.855453	0.000028
O	4.904666	-1.732281	-0.00061
H	4.605444	2.868582	-0.000069
H	-0.18058	-3.717905	0.000737
H	-5.583113	-1.949907	0.000628
H	-4.328981	3.544211	-0.000403
H	5.74918	-1.23867	-0.000638

MALVIDINA C₃

C	-4.547249	-0.791179	0.042472
C	-5.250925	0.392369	-0.000504
C	-4.556928	1.622843	-0.055815
C	-0.282312	-0.524368	0.0008
C	-0.882682	-1.87459	0.058864
C	-2.322119	-1.926404	0.071727
O	-5.109999	-2.007145	0.095508
O	-5.322294	2.718762	-0.095931
H	-2.617799	2.623686	-0.110796
H	-6.335471	0.413335	0.005984
H	-2.774205	-2.911129	0.11429
C	1.099666	-0.20481	-0.024215
C	1.506738	1.158687	-0.058395
C	2.090632	-1.233775	-0.003384
H	0.77543	1.955212	-0.063147
H	1.775607	-2.265315	0.033593
C	2.841004	1.522626	-0.0939
C	3.417882	-0.877736	-0.038378
C	3.818044	0.490108	-0.106842
O	5.11399	0.78211	-0.195103
H	5.611814	-0.057524	-0.190364
O	-0.196673	-2.915897	0.09516
O	-1.10519	0.547598	-0.035434
O	3.125055	2.838659	-0.198407
O	4.483416	-1.71795	-0.040532
H	-6.076633	-1.946546	0.098859
H	-4.788421	3.526093	-0.134592
C	4.245569	-3.132766	-0.01239
H	3.672347	-3.444166	-0.891178
H	5.229822	-3.598099	-0.026915
H	3.713456	-3.415079	0.901311
C	4.258799	3.404371	0.491275
H	5.189758	3.194385	-0.035895
H	4.072401	4.47809	0.505684
H	4.31772	3.029475	1.517594

PELARGONIDINA C₃

C	-3.604049	0.796819	0.000034
C	-4.330644	-0.374444	0.000277
C	-3.660732	-1.618243	0.000462
C	0.656901	0.443798	-0.000116
C	0.079855	1.806908	-0.000331
C	-1.357546	1.889134	-0.000272
O	-4.141958	2.023401	-0.000155
O	-4.444695	-2.699845	0.000695
H	-1.739836	-2.657652	0.000546
H	-5.415403	-0.374166	0.000332
H	-1.789124	2.884066	-0.000424
C	2.03275	0.097031	-0.000109
C	2.42803	-1.278295	0.000166
C	3.057609	1.091785	-0.000381
H	1.67017	-2.051279	0.000381
H	2.774843	2.135052	-0.000586
C	3.751815	-1.636024	0.000166
C	4.38653	0.730483	-0.000385
C	4.749402	-0.632113	-0.000112
O	6.016219	-1.049536	-0.000099
H	6.636235	-0.304092	-0.000289
O	0.790126	2.831797	-0.000549
O	-0.184706	-0.610459	0.000103
H	4.061237	-2.674901	0.000379
H	5.156815	1.496634	-0.0006
H	-5.109919	1.984829	-0.0001
H	-3.928012	-3.519342	0.000813

PEONIDINA C₃

C	4.11422	-0.559646	0.000141
C	4.661421	0.705462	-0.000024
C	3.815961	1.836937	-0.00024
C	-0.152803	-0.842904	-0.000038
C	0.621525	-2.106703	0.000163
C	2.054751	-1.971647	0.000223
O	4.827139	-1.694405	0.000343
O	4.43356	3.023445	-0.000394
H	1.765364	2.583159	-0.000452
H	5.734494	0.864232	0
H	2.629554	-2.891164	0.000388
C	-1.562207	-0.70254	-0.00005
C	-2.152046	0.603863	0.000141
C	-2.416708	-1.847595	-0.000334
H	-1.514264	1.476268	0.000371
H	-1.970384	-2.831546	-0.000456
C	-3.517773	0.740671	0.000081
C	-3.787517	-1.702505	-0.000441
C	-4.356211	-0.421818	-0.000227
O	-5.675333	-0.282783	-0.000307
H	-5.894578	0.666909	-0.000125
O	0.078709	-3.228097	0.000286
O	0.525473	0.32774	-0.000166
O	-4.231717	1.893237	0.000292
H	-4.44724	-2.562468	-0.000691
H	5.778597	-1.512981	0.000358
H	3.800644	3.756443	-0.000565
C	-3.53369	3.142227	0.000657
H	-2.914291	3.238612	-0.897431
H	-4.302562	3.913282	0.000813
H	-2.914392	3.238146	0.898865

12. GLOSARIO

ALIMENTO FUNCIONAL. Alimento para uso específico de la salud, aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o mas funciones específicas en el cuerpo, mas allá de los efectos nutricionales adecuados.

ANTINEOPLÁSICO. Agente que inhibe o previene la proliferación de células cancerosas. Medicamento que inhibe o previene el desarrollo del cáncer porque evita el crecimiento de las células tumorales.

ANTIINFLAMATORIO. Agente que inhibe y/o previene la inflamación en las células. Sustancia que reduce o elimina las inflamaciones o hinchazones de los tejidos.

ANTIOXIDANTES. Un conjunto heterogéneo de sustancias (vitaminas, minerales, pigmentos naturales, compuestos vegetales y enzimas), que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. El término antioxidante significa que impide la oxidación perjudicial de otras sustancias químicas ocasionada durante las reacciones metabólicas o producida por los factores exógenos como las radiaciones ionizantes.

CANCERÍGENO: Agente físico o químico que induce el desarrollo del cáncer. Virus, sustancias o factores que se consideran que pueden favorecer el desarrollo del cáncer, (virus de Epstein Barr, papiloma, tabaco, asbesto, radioactividad y radiación solar).

DESLOCALIZACIÓN ELECTRÓNICA. Es el fenómeno que se produce cuando uno o varios electrones pueden distribuirse o moverse entre varios centros (por ejemplo, átomos en una molécula). De acuerdo con la mecánica cuántica, todos los electrones de un sistema son equivalentes e indistinguibles, y carecen de trayectoria, de forma que no es estrictamente correcto decir que en una molécula hay N pares de electrones localizados y m electrones itinerantes o deslocalizados.

ESTRUCTURA PRIMARIA. Es la estructura “padre” u original. Es decir, la estructura a la que no se le ha quitado ningún átomo de hidrógeno. En este caso, las antocianinas mostradas en la **Figura 9**.

ENERGÍA DE DISOCIACIÓN DE ENLACE. Energía necesaria para romper un enlace O-H. Es la energía que un radical libre necesita para quitar un átomo de hidrógeno a un compuesto antioxidante.

NUTRACEUTICOS. Son componentes de los alimentos o partes del mismo que aportan un beneficio añadido para la salud, capaces de proporcionar beneficios médicos, inclusive para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Son agentes bioactivos proporcionados en forma concentrada para mejorar las características nutritivas, son componentes del alimento, o una mezcla compleja de sustancias químicas, fisiológicamente activas, cumpliendo una función igual que los nutrientes de los alimentos, contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas.

ORBITALES MOLECULARES. Son el resultado de la combinación lineal de orbitales atómicos de una estructura.

OPTIMIZACIÓN DE GEOMETRÍA. Es un proceso por medio del cual un programa computacional busca un mínimo global en la superficie de energía potencial.