



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Básicas e Ingeniería. Unidad Iztapalapa.

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ESTRUCTURA
DEL ANILLO B DE FLAVONOLES EN SUS
CONSTANTES DE ACIDEZ Y
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Tesis que Presenta
RUSLÁN RAULIEVICH ALVAREZ DIDUK
Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)

Asesores: Dra. Maria Teresa Ramírez Silva
Dr. Arben Merkoçi

Jurado:
Presidente: Annik Vivier Jégoux
Secretario: María Teresa Ramírez Silva
Vocal: Mario Romero Romo
Vocal: Patricia Balderas Hernández
Vocal: Fernando Cortés Guzmán

Mexico, D.F. Agosto de 2014

Dedicado a:

A mi pequeño hijo Gabriel por ser mi nueva luz, mis ganas de vivir, por hacerme tan feliz y darme las fuerzas para salir adelante, que ha hecho tanto por mí en un añito de vida y todavía no lo sabe.

AGRADECIMIENTOS

A Nina porque gracias a ella le dí un mejor sentido a mi vida

Quiero agradecer a mi familia, a mi padre, mi madre, Annia, Gabriela, Claudia por la paciencia, las charlas profesionales y personales, los consejos. Porque siempre puedo contar con ellos.

A mi Asesora María Teresa Ramírez Silva, por todo el apoyo que me ha dado desde la licenciatura, por la amistad, por estar siempre cuando la necesito.

A mis compañeros del laboratorio y mis compañeros de vida, mis amigos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo y patrocinio para la realización de esta tesis doctoral.

Al Área de Química Analítica y Al Instituto Catalán de Nanotecnología por proveer la infraestructura para realizar esta investigación

A los miembros del jurado por las discusiones y los consejos para mejorar este documento.

Al Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo de UAM - Iztapalapa por el acceso a sus facilidades de cómputo.

Índice

1	Abreviaturas.....	3
2	Resumen	4
3	Abstract.....	6
4	Introducción General.....	7
5	Objetivos	12
5.1	General.....	12
5.2	Particulares.....	12
6	Hipótesis	13
7	Constantes de acidez	14
7.1	Metodología	17
7.1.1	Reactivos	17
7.1.2	Estudio Espectrofotométrico	18
7.2	Resultados y Discusión	19
7.2.1	Estabilidad	19
7.3	Determinación de las constantes de acidez	23
8	Estudio teórico del Mecanismo de Desprotonación	28
8.1	Detalles computacionales	28
8.2	Escogiendo la metodología	28
8.3	Estructuras	31
8.4	Desprotonaciones	33
8.5	Intermediario radicalico de la Miricetina.....	38
9	Síntesis de puntos cuánticos y su interacción con los flavonoides.....	41
9.1	Metodología	42
9.1.1	Síntesis de nanopartículas de CdS.....	42
9.1.2	Tratamiento y Caracterización de las nanopartículas:	42
9.1.3	Inhibición de fluorescencia de CdS.....	43
9.2	Resultados y discusión	43
9.2.1	Síntesis de Nanopartículas de sulfuro de cadmio	43

9.2.2	Caracterización	44
9.2.3	Uso de CdS en la determinación de Flavonoides	52
9.2.4	Inhibición de Fluorescencia	55
9.2.5	Relación de inhibición con la estructura	59
9.2.6	Mecanismo de reacción	62
10	Capacidad Antioxidante con DPPH	63
10.1	Metodología	63
10.2	Resultados y discusión	64
11	Estimación de la actividad antioxidante mediante cálculos teóricos.....	70
11.1	Metodología (Cálculos termodinámicos y cinéticos)	71
11.2	Resultados y Discusión	73
11.2.1	Cálculos Termodinámicos.....	73
11.2.2	Cálculos Cinéticos.....	75
12	Comparación de los métodos para la actividad antioxidante	79
13	Conclusiones.....	80
14	Perspectivas	82
15	Referencias	83
16	Anexos.....	92
17	Artículo relacionado con esta tesis.....	109

1 Abreviaturas

AD	Ángulo Diedro
CAA	Actividad antioxidante celular
CdS	Puntos cuánticos de Sulfuro de Cadmio
DCPI	2,6 Diclorofenolindofenol
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC	Electroforesis Capilar
MAA	Ácido mercaptoacético
MDC	Modelos dieléctricos continuos
NMA	Numero de moléculas explícitas de agua
ORAC	Capacidad antioxidante relativa a oxígeno atómico
PDMS	Polidimetilsiloxano
PS	Punto simple
QM-ORSA	Quantum Mechanics-based test for Overall free Radical Scavenging Activity
RMN	Resonancia magnética nuclear
TEAC	Capacidad antioxidante relativa a Trolox
TEM	Microscopia de transmisión de electrones
TST	Teoría convencional del estado de transición

2 Resumen

Cuatro flavonoles: Quercetina, Morina, Kaempferol y Miricetina con características estructurales similares pero con diferente número y posición de grupos OH en uno de sus anillos (anillo B) fueron estudiados con el fin de determinar su estabilidad, constantes de acidez, el orden de desprotonación y su actividad antioxidante en solución acuosa. Para analizar la estabilidad de estos compuestos y determinar las constantes de acidez se empleó espectrofotometría UV-Vis a diferentes valores de pH. Los mecanismos de desprotonación fueron calculados con la ayuda de la química computacional, usando la Teoría de los Funcionales de la Densidad. Los cálculos se realizaron en solución acuosa utilizando el modelo continuo SMD y los resultados fueron reportados como energías de desprotonación. Los resultados muestran que tanto la Quercetina como la Miricetina son altamente inestables a valores de pH básico. El Kaempferol, por otro lado, es mucho más estable y la Morina es el único entre los compuestos estudiados, que no se vio afectado por el valor de pH. A pesar de este inconveniente, sus constantes de acidez se estimaron mediante el análisis de su cinética de descomposición y se propone como consecuencia la corrección de los espectros. Se obtiene una correlación entre los valores de pKa y los observados experimentalmente y el ΔG calculado de las desprotonaciones sucesivas. Por otra parte se sintetizaron nanocristales de sulfuro de cadmio, se caracterizaron usando TEM y se observa como los flavonoles inhiben la fluorescencia de estas nanopartículas, proponiéndose así un método de determinación, selectivo a flavonoles. El porcentaje de inhibición depende de la estructura del compuesto y podría relacionarse con la actividad antioxidante. Por último se determinó la capacidad antioxidante usando el método del DPPH donde los resultados indican que la Miricetina es la más reactiva. Además se evidencia la regeneración del grupo catecol en Metanol. También se emplearon cálculos computacionales considerando todos los posibles mecanismos de reacción frente al radical OOH^{\bullet} donde se demuestra la importancia de considerar todos los posibles mecanismos de reacción y las fracciones molares de las especies a un determinado valor de pH, se analizó el mecanismo de transferencia electrónica donde la Miricetina sigue siendo la más reactiva. No obstante el mecanismo predominante

frente al radical estudiado es el de transferencia de Hidrógeno obteniéndose que la Morina es la más reactiva por esta vía con una constante de velocidad limitada por difusión.

3 Abstract

Four flavonols namely: Quercetin, Morin, Kaempferol and Myricetin were studied using spectrophotometry UV/Vis, in aqueous solution. The study was performed varying the pH to analyze the stability of these compounds, and to estimate their acidity constants. In addition, the deprotonation mechanisms were studied using computational chemistry, within the Density Functional Theory framework. The calculations were performed in aqueous solution using the SMD continuum model and the results are reported as deprotonation energies. Our results show that both quercetin and myricetin are highly unstable at basic pH . Kaempferol, on the other hand, is much more stable; and morin is the only one, among the studied compounds, that was not affected by pH . In spite of this inconvenience, their acidity constants were estimated through analysis of their decomposition kinetics, correcting the spectra accordingly, and obtaining a correlation of values between the experimentally observed pK_a and the calculated ΔG of successive deprotonations. On the other hand cadmium sulfide nanocrystals were synthesized and characterized using TEM. A fluorescence quenching of these nanoparticles was observed in the presence of flavonoids. This allows proposing a high selective method of determination for this kind of compounds. The percentage of inhibition depends on the structure of the compound and might be related to their antioxidant activity. The antioxidant capacity was estimated using the traditional DPPH method. The results indicate that Myricetin is the most reactive among all the studied flavonoids. Furthermore, regeneration of the catechol group in methanol was postulated. In addition computational calculations were also employed to estimate the antioxidant activity, considering different reaction mechanisms and reactions with the OOH radical. For the electron transfer mechanism the obtained trend is similar to that arising from the DPPH assay. However the predominant mechanism for the hydroperoxyl radical scavenging activity of these compounds is the hydrogen transfer. Morin was found to be the most reactive of the studied compounds via H transfer, with rate constant within the diffusion-limited regime. This methodology demonstrates the importance of considering the molar fraction of the chemical species at a fixed pH .

4 Introducción General

La oxidación es la pérdida de electrones de una especie química, este tipo de reacciones representan una parte esencial de la vida aeróbica de nuestro metabolismo.¹ Sin embargo, pueden surgir problemas cuando en un proceso de oxidación hay una transferencia de electrones desapareados, por lo que se generan radicales libres. Los radicales libres forman parte del metabolismo en los seres vivos. En un organismo sano hay un delicado balance entre la producción y la eliminación de radicales libres y son beneficiosos a bajas o moderadas concentraciones. Son necesarios en el proceso de maduración de la estructura celular,² e incluso ayudan al sistema inmune a eliminar microorganismos patógenos.³ En contraste, a altas concentraciones pueden ser muy perjudiciales para la salud. Son muy reactivos y atacan rápidamente moléculas de las células cercanas provocando daños irreversibles en los lípidos de las membranas celulares, las proteínas en los tejidos (modificación de proteínas), carbohidratos y el ADN. Este proceso oxidativo juega un papel crucial en el envejecimiento y algunas enfermedades degenerativas tales como cataratas, Alzheimer, disfunción cognitiva, enfermedades cardíacas e incluso el cáncer.^{4,5,6}

En la actualidad debido a la contaminación, la radiación UV, el humo de tabaco, el consumo de grasas altamente polinsaturadas, se produce un exceso de radicales libres, por lo que el organismo requiere una dieta abundante en antioxidantes.^{7,8} Los que produce naturalmente el organismo no son efectivos frente a muchos radicales o no son suficientes.⁹ Una sustancia antioxidante por definición es aquella que reacciona más rápidamente con un radical libre que con una especie de interés biológico, para proteger a ésta y dar un producto más estable que el radical inicial y menos dañino. Debido a lo antes expuesto hay un creciente interés en la comunidad científica en estudiar estas sustancias que pueden ayudar a prevenir o detener la oxidación de compuestos vitales para el ser humano.

Los antioxidantes más conocidos en la dieta son las vitaminas C, E, A y los carotenoides, los cuales se han estudiado intensamente.¹⁰ Además de estas vitaminas, otras sustancias provenientes de las plantas son las responsables de

ofrecer protección frente a los fenómenos oxidativos, estos compuestos están prácticamente en todos los alimentos de origen vegetal y se denominan compuestos polifenólicos (fenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, y los lignanos).

Los polifenoles y en especial los flavonoides que forman parte de los pigmentos naturales de las plantas, son sustancias frecuentemente consumidas por los humanos ya que están presentes en la dieta diaria a través de una gran variedad de alimentos como frutas, vegetales, vino, café, té, cerveza, etc.^{11,12} Algunos ejemplos de alimentos en la dieta con gran contenido de flavonoides son el cacao, el té negro, las uvas rojas, la granada, arándano, pera, manzana, fresas, cebolla roja, betabel, maíz, brócoli, café entre otros.¹¹ Varias investigaciones demuestran las diferentes propiedades biológicas de estos compuestos,^{13,14} como por ejemplo cardioprotectoras¹⁵⁻¹⁸ antiinflamatorias,^{19,20} y antivirales.²¹ También han demostrado ser eficaces en la prevención y el tratamiento del cáncer,^{22,23} enfermedades neurodegenerativas,^{24,25} para prevenir daños en la piel²⁶ y osteoporosis.²⁷ Por otra parte, otros estudios han revelado que este tipo de compuestos brindan protección frente a los fenómenos oxidativos y esto se debe a su estructura química.²⁸⁻³⁷ Presentan excelentes propiedades de complejación del hierro y otros metales de transición, lo cual les confiere una gran capacidad antioxidante.^{38,39}

La ingesta de estos compuestos varía entre 50 y 800 mg por día, en particular el vino tinto y el té, contienen grandes concentraciones de polifenoles, por ejemplo en una copa de vino, se encuentran aproximadamente 200 mg de compuestos fenólicos.⁴⁰ Las grandes variaciones se deben a las costumbres y dieta de cada país. En regiones donde hay un elevado consumo de vino, frutas y vegetales las personas tienden a tener un tipo de vida más saludable.⁴¹

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que en su estructura comparten dos anillos fenólicos A y B ligados a través de un anillo C de pirano. Los átomos de carbono en los anillos A y C se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6'.⁴² En la figura 4.1 se muestra el esqueleto general de los flavonoides donde en las posiciones de 2' a 6' y de 5 a 8 presentan grupos hidroxilo dependiendo del compuesto en particular.

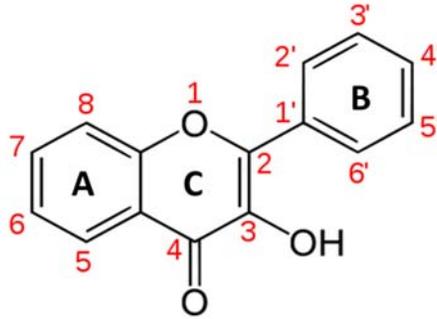


Figura 4.1 Esqueleto de los flavonoides y numeración.

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de sus características estructurales.⁴³ Estas son, el número y posición de grupos OH en el anillo B, el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, la presencia de grupos hidroxilo en los sitios 3 y 5, y la carboxilación del anillo C.⁴⁴

En función de estas características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en (Figura 4.2):

- Flavanoles, aquellos con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

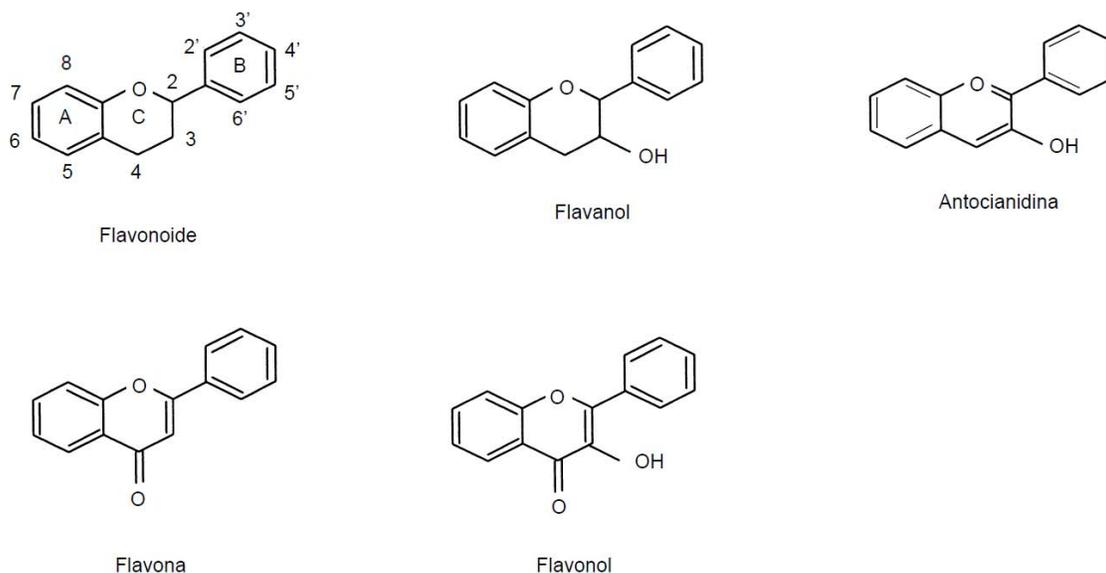


Figura 4.2 Clasificación de los flavonoides según su estructura.

Si bien se han realizado estudios que demuestran el poder antioxidante de estas sustancias, desafortunadamente las pruebas en humanos son limitadas y hasta cierto punto controversiales.⁴⁵ Una de las causas por la que existe controversia en el poder antioxidante, es que las pruebas se realizan bajo diferentes condiciones y en muchos casos no se tiene conocimiento de las constantes de acidez o hay discrepancias en los valores reportados.

La capacidad antioxidante se puede evaluar de diversas formas. Una de ellas es la determinación relativa a algún antioxidante patrón frente a un mismo radical, por ejemplo como capacidad antioxidante relativa a Trolox (TEAC) por sus siglas en inglés. Otra forma es midiendo directamente como los compuestos de interés inhiben la oxidación de algún tejido en particular, por ejemplo estimando actividad antioxidante celular (CAA). También se puede medir como la eficiencia para desactivar un radical libre en particular, por ejemplo utilizando al oxígeno atómico (ORAC). Existe mucha polémica con respecto a cuál de estas técnicas es más efectiva porque en muchos casos conducen a resultados contradictorios.⁴⁶

De los compuestos a estudiar en este proyecto, y en base a su estructura y los criterios mencionados en la introducción, es de esperar que la Miricetina sea el más

eficaz seguido de la Quercetina. Estudios realizados sobre flavonoles en particular muestran que efectivamente la Miricetina mediante el uso de las técnicas TEAC y ORAC posee mejores propiedades antioxidantes que la Quercetina.⁴⁷ Otros estudios donde se utiliza la técnica de CAA muestran que la eficacia de la Quercetina es tres veces más grande que la Miricetina, incluso la Morina y el Kaempferol muestran más actividad inhibiendo la oxidación de células.⁴⁸ Por otra parte estudios realizados sobre la membrana celular de la sangre en las ratas se pone en evidencia que bajo condiciones diferentes se invierte el orden en la actividad antioxidante de estos flavonoles.⁴⁹

En este trabajo se escoge un conjunto de flavonoles que se diferencian en la posición y el número de grupos hidroxilo en el anillo B, los cuales son Quercetina, Morina, Miricetina y Kaempferol. De ellos se estudia su estabilidad, sus constantes de acidez, orden de desprotonación, determinación de actividad antioxidante por varios métodos y determinación utilizando puntos cuánticos.

5 Objetivos

5.1 General

Estudiar la relación estructura-capacidad antioxidante de un conjunto de flavonoles (Quercetina, Kaempferol, Miricetina y Morina).

5.2 Particulares

- 1- Estudiar la estabilidad de cada uno de los antioxidantes bajo diferentes condiciones de pH.
- 2- Determinar las constantes de acidez de la Quercetina, Kaempferol, Miricetina y Morina mediante espectrofotometría UV-Vis y el método computacional SQUAD.
- 3- Proponer el orden de desprotonación de los compuestos mediante el uso de cálculos teóricos y la teoría de los funcionales de la densidad.
- 4- Síntesis y caracterización de Puntos Cuánticos de Sulfuro de Cadmio en solución acuosa
- 5- Estudiar la capacidad antioxidante relativa de estos compuestos utilizando diferentes técnicas: Puntos Cuánticos, (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH y Química Computacional.
- 6- Proponer una relación estructura-actividad antioxidante en función de los resultados obtenidos

6 Hipótesis

Se asume que existe una relación entre la estructura y la actividad antioxidante de estos compuestos, suponiendo que a medida que hay presentes más grupos hidroxifenólicos en el anillo B mayor será la actividad antioxidante.

7 Constantes de acidez

Debido a la presencia de varios grupos fenólicos en su estructura, es de esperar que los polifenoles tengan varias constantes de acidez en solución acuosa las cuales se expresan comúnmente como valores de pKa. Esto significa que dependiendo del valor de pH del medio la estructura ácido-base predominante de la sustancia puede cambiar y por consiguiente sus propiedades químicas. Por ejemplo hay varios estudios que demuestran que el pH influye en la actividad antioxidante de diferentes compuestos químicos debido a la abundancia relativa de sus formas ácido-base.⁵⁰⁻⁵² El valor de pH varía en el cuerpo humano desde 1.5 hasta 8 por ejemplo el del estómago es 1.5, mientras que el de los intestinos es 5.3, la saliva 6.4 y la sangre 7.4.⁵³ Por esta razón es importante conocer precisamente la cantidad y la forma de las diferentes especies para poder entender correctamente sus propiedades y en especial su actividad. Esto es particularmente importante en los medicamentos por ejemplo, si éste se encuentra en su forma iónica aumenta su solubilidad en medio acuoso, mientras la forma neutra es la que se absorbe en el organismo mediante el transporte pasivo a través de la membrana.⁵⁴

En la actualidad existen varias técnicas para determinar de forma satisfactoria las constantes de acidez. Entre ellas, las más utilizadas son las potenciométricas,⁵⁵ espectrofotométricas,^{56,57} la electroforesis capilar (EC),⁵⁸ y la resonancia magnética nuclear⁵⁹ (RMN). La eficiencia de estos métodos en la determinación de los valores de pKa depende básicamente de la naturaleza química del compuesto a estudiar, la solubilidad y la estabilidad de las especies involucradas en el estudio experimental bajo condiciones determinadas. Por ejemplo en el caso de especies que contienen grupos catecol, se ha observado una baja estabilidad a pHs básicos, como es el caso de la dopamina.⁶⁰ Es por ello que es muy importante realizar estudios relacionados con estos aspectos antes de elegir una de estas técnicas. En general los experimentos basados en EC y RMN toman bastante tiempo, por lo que no es recomendado para el estudio de especies químicas con baja estabilidad. En esos casos, la técnica Espectrofotométrica UV-VIS es la mejor opción, ya que es rápida y se pueden hacer mediciones puntuales, no requiere de una alta solubilidad de los compuestos a estudiar y además los datos obtenidos de esta forma se pueden refinar con programas diseñados para ello como es Stability QUotients from Absorbance Data (SQUAD).^{61,62}

Debido a lo antes expuesto, la técnica espectrofotométrica fue la empleada en el presente trabajo para determinar las constantes de acidez de cuatro flavonoides (Quercetina, Morina, Miricetina y Kaempferol). Esta familia de compuestos fue la elegida debido a que ellos son los más abundantes la dieta de los humanos, la Quercetina es probablemente una de las más estudiadas conteniendo dos grupos fenólicos en el anillo B. No obstante es importante destacar que el comportamiento químico y la actividad biológica de estos compuestos está relacionada con el número y la posición de los grupos OH en el anillo B.⁶³⁻⁷⁰ Por consecuencia los otros flavonoles escogidos para el presente estudio difieren en el número y la localización de estos grupos en el anillo B, éstos son la Morina, Miricetina, y Kaempferol. Ver Figura 7.1

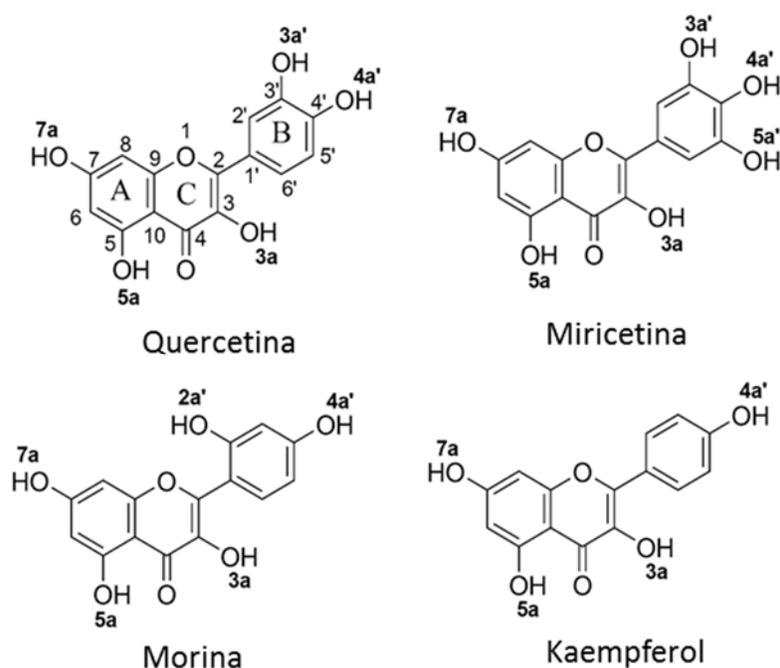


Figura 7.1 Estructura y numeración de los flavonoides estudiados en este trabajo.

En base a su estructura y en particular en el número de grupos fenólicos de cada una, se puede la existencia de al menos 4 valores de pKa para el Kaempferol, 5 valores para la Quercetina y la Morina y 6 valores de pKa para la Miricetina. No obstante no todos ellos han sido identificados a la fecha, Tyukavkina y Pogodaeva reportaron dos valores de pKa para el Kaempferol,⁷¹ mientras Herrero-Martínez y colaboradores,⁷² midieron tres valores de pKa para este compuesto usando EC y 4 valores cuando lo combinaron con el programa computacional

SPARC (ver tabla 7.1). Estos datos parecen estar completos para este compuesto ya que obtuvieron tantos pKas como grupos fenólicos tiene el Kaempferol. El problema es la discrepancia que hay en ellos ya que para el primer pKa la diferencia es de 1.15 unidades lo cual es muy grande y no está explicado en sus estudios.

Tabla 7.1 Valores de pKa extraídos de la literatura.

Flavonol	pKa1	pKa2	pKa3	pKa4	Método ^(a)	Ref.
Kaempferol	8.2	9.5			3	71
	7.05	9.04	11.04		2	72
	7.11	9.09	11.33	13.26	4	72
Morina	3.46	8.1			3	73
	4.99	8.23	10.34		1	74
	5.06	8.64	10.62		2	72
	6.93	8.32	9.98	11.98	4	72
Quercetina	7.3	8.4			3	71
	6.62	9.7			1	75
	7.19	9.36	11.56	-	2	72
	6.74	9.02	11.55		3	73
	7.71	9.44	11.46		1	74
	7.59	9.33	11.56			74
	7.04	8.55	11.26	13.06	4	72

(a) 1 = potenciometría, 2 = EC, 3 = espectrofotometría, 4 = EC + SPARC

Para la Morina hay 4 trabajos previos. Slobodan y colaboradores,⁷³ reportaron dos valores, mientras que Herrero-Martínez y colaboradores., encontraron 3,^{72,74} y cuatro valores,⁷² dependiendo de la técnica utilizada. En este caso las discrepancias más grandes corresponden también al primer pKa, no obstante, éstos son más grandes que en el caso del Kaempferol con rangos desde 1.53 a 3.47 *unidades de pKa*. Tanta dispersión en los valores definitivamente merece una explicación además de que, para este compuesto en particular nunca se llegaron a todas las desprotonaciones posibles que son 5.

Este es el caso de la Quercetina que a pesar de la gran cantidad de trabajos previos relacionados con las constantes de acidez, este compuesto tiene 5 grupos fenólicos por lo cual se esperan 5 valores de pKa y se han reportado solo dos,^{71,75} tres,⁷²⁻⁷⁵ y cuatro⁷² *valores de*

pKa. Para este compuesto las discrepancias son menores que en los anteriores sin embargo en ciertos casos éstas llegan a más de una unidad de *pKa*.

En el caso de la Miricetina que se ha reportado como uno de los mejores compuestos en relación a su actividad antioxidante,⁷⁶ no existen valores de *pKa* reportados a la fecha, lo cual es una excelente oportunidad para cubrir ese vacío en la literatura.

Considerando la información proporcionada hasta ahora es evidente que hay datos importantes que faltan en este conjunto de compuestos relacionado a sus equilibrios ácido-base. Los más importantes son la carencia de valores de *pKa* y las discrepancias entre los mismos sin explicaciones consecuentes. Además se necesita una investigación relacionada con los órdenes de desprotonación. A pesar de que se han realizado algunas elucidaciones en este sentido, no existe un trabajo detallado y sistemático en el cual consideren todas las posibles especies. Tampoco existe ninguna demostración relacionada con el mecanismo de desprotonación lo cual se asume que está incompleto para la Quercetina y la Morina y faltante para la Miricetina. Además la mayoría de los trabajos reportados son estudios donde se utilizan mezclas de alcoholes y agua y no se reportan estas constantes en solución acuosa

Es por ello que en este trabajo se realiza la determinación de las constantes de acidez de estos flavonoles en medio acuoso, evaluando la estabilidad de cada una de las moléculas a diferentes valores de pH, y al complementar con un estudio teórico se puede obtener la estructura que corresponde a cada especie química. Esto servirá de gran ayuda para el objetivo fundamental que es relacionar la actividad antioxidante a la estructura de estas moléculas considerando las constantes de disociación y las especies químicas involucradas a un valor de pH fisiológico.

7.1 Metodología

7.1.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo se encuentran detallados en el anexo 1

7.1.2 Estudio Espectrofotométrico

Las soluciones madre de Quercetina, Miricetina, Kaempferol y Morina se preparan disolviendo 10 mg de cada una en 10 mL de metanol. Se prepara un amortiguador Robinson Britton 0.2 M. Posteriormente se hacen tantas soluciones de amortiguador 0.05M como valores de pH se quieran medir, partiendo del amortiguador concentrado se agrega hidróxido de sodio 2 M hasta lograr el valor de pH deseado y se agrega agua hasta obtener una concentración final del amortiguador 0.05 M, Los valores de pH se miden con un potenciómetro PHM210 equipado con un electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl PHC3359-8. El mismo procedimiento se hace para cada valor de pH. Las mediciones se obtienen en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 950, se toman 2.5 mL de la solución amortiguador con el valor de pH ajustado, se agregan en una celda de cuarzo de longitud de paso óptico de 1cm y se añade una alícuota de solución madre de flavonoide, se agita rápidamente y se obtiene el espectro de absorción desde 220 nm a 600 nm o según las bandas observadas. Para el estudio de estabilidad se toma un segundo espectro de absorción inmediatamente después del primero y se observa si hay cambios, en caso de haberlo, se toma una serie de espectros de la misma solución a diferentes tiempos. Una vez que se tienen todos los espectros de absorción, se construye una gráfica de absorbancia en función de la longitud de onda a cada valor de pH y se observan las longitudes de onda donde hay cambios. Se grafica la absorbancia en función del valor de pH en las longitudes de onda observadas y el valor de pH donde se encuentren puntos de inflexión se toma como referencia, para proponer un valor de pKa. Finalmente se alimentan todos los espectros de absorción a cada valor de pH al programa computacional SQUAD^{61,62} (anexo 2), junto con las concentraciones de cada flavonoide, los pKa propuestos transformados a β (constantes de formación global de los equilibrios químicos) y el modelo del número de constantes que se han observado, para obtener una serie de valores refinados de $\log \beta$ para cada equilibrio ácido base, más otros datos importantes como los coeficientes de absorptividad molar a cada longitud de onda, los errores respectivos, la correlación etc. Todas las mediciones se hicieron en atmósfera de Nitrógeno. La concentración final de Metanol fue de 0.7%. Los valores de pH fueron corregidos de acuerdo a lo descrito en el anexo 3.

7.2 Resultados y Discusión

7.2.1 Estabilidad

Las especies que tienen grupos tipo catecol en su estructura, presentan baja estabilidad en medio acuoso, por lo que es importante analizar el comportamiento de todos los flavonoles en este medio antes de la determinación de sus constantes de acidez. Con el objetivo de obtener resultados confiables es muy importante garantizar la integridad física de las moléculas durante todo el experimento. Para ello se realiza un estudio de estabilidad a diferentes valores de pH en atmósfera inerte (N_2) y en ausencia de la luz.

7.2.1.1 *Morina y Kaempferol*

Se encuentra que la Morina 5.0×10^{-5} M es estable en los intervalos de pH de 1.8 a 13.4 por más de 5 minutos. Es importante señalar que los experimentos se obtienen en un intervalo de tiempo muy corto. Para el Kaempferol 3.73×10^{-5} M, el estudio de estabilidad se lleva a cabo en los intervalos de pH de 1.8 a 11.6, se encuentra que este compuesto permanece estable (más del 98%) a los 5 minutos y al más elevado valor de pH. Por otra parte la Miricetina y la Quercetina son menos estables, especialmente cuando se incrementa el valor de pH lo cual se describe a detalle a continuación.

7.2.1.2 *Miricetina*

Para la Miricetina 5.8×10^{-5} M, el estudio de estabilidad se lleva a cabo de pH 1.8 a 11.6. La molécula es estable por al menos 5 min en los intervalos de 1.85 a 8.55, pero a valores más altos de pH las bandas de absorción correspondientes al compuesto decrecen en el tiempo (figura 7.2). Después de 4.5 minutos a un valor de pH de 9.36 se puede observar como la intensidad de las bandas a 420 nm y 280 nm decrecen en un 10%, la banda a 320 nm se intensifica y aparece una nueva banda en 650 nm. A valores más altos de pH y en menor intervalo de tiempo se sigue observando la misma tendencia pero los cambios en las intensidades aumentan aún más. Cuando el valor de pH es de 11 la banda a 420 nm desaparece totalmente después de 3.45 min además de que la forma general del espectro cambia drásticamente.

Con base en estos resultados se puede afirmar que la estimación de las constantes de acidez de la Miricetina no se puede hacer potenciométricamente de la forma habitual (valoración

continua con NaOH). A pesar de esto, esta técnica puede emplearse si se toman las precauciones correspondientes, las cuales se explican a continuación.

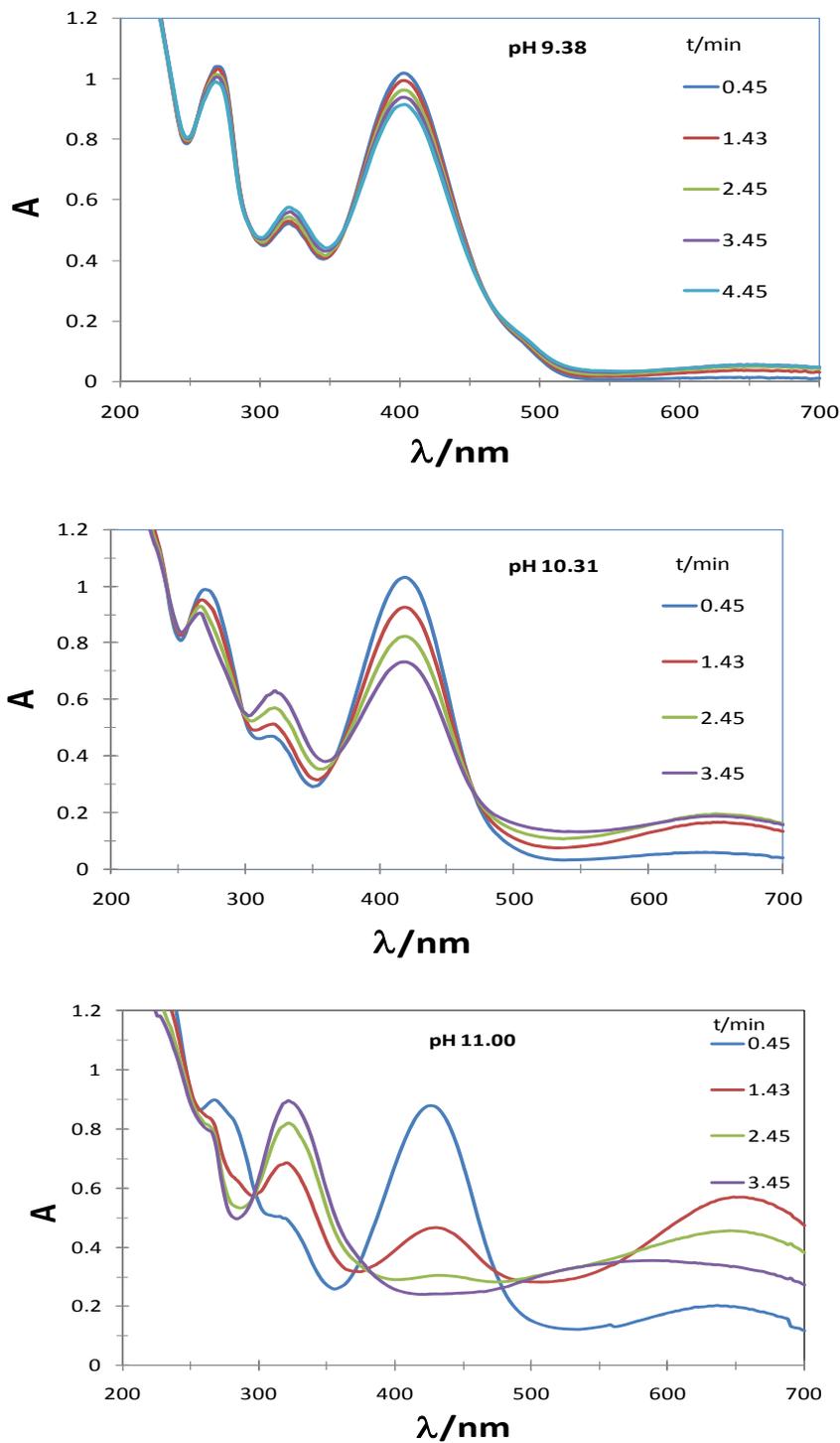


Figura 7.2. Espectros de absorción de la Miricetina 5.8×10^{-5} M en el tiempo a diferentes valores de pH.

Si se observa la figura 7.2, mientras se registra el espectro de absorción de la Miricetina, sobre todo a pH=11.0, se presentan cambios en las absorbancias a las diferentes longitudes de onda debidas a la descomposición de la molécula. Por lo tanto no es posible utilizar estos espectros de absorción para la determinación de las constantes de acidez. Es por ello que se diseña una metodología con la cual es posible en algunos de los valores de pH, recuperar el espectro de absorción que se tendría en el tiempo inicial (antes de la descomposición de la especie). Esta metodología es una aportación interesante de este trabajo, ya que permite determinar valores de constantes de acidez con precisión, cuando se tiene problemas de estabilidad.

Para ello se crea una nueva curva para estimar el espectro de absorción a tiempo cero (figura 7.3). Esto se consigue al probar que en cortos períodos de tiempo existe una tendencia lineal de la absorbancia a una longitud de onda en el tiempo, a pesar de que es un hecho de que la molécula se está descomponiendo. La curva se obtiene tomando datos de la absorbancia como función del tiempo transcurrido a longitudes de onda específicas, dependiendo del valor de pH (por ejemplo $\lambda^{\text{pH}=9.6}=407$ nm, $\lambda^{\text{pH}=10.21}=417$ nm, y $\lambda^{\text{pH}=11.0}=430$ nm,) La variación en la longitud de onda se debe a los desplazamientos batocrómicos causados por el incremento en el pH (ver las líneas sólidas en figura 7.3). Los puntos en esta figura corresponden a los datos espectrales obtenidos midiendo continuamente los espectros de absorción. La correlación que existe entre las medidas tomadas de estas dos formas diferentes hace posible que se pueda extrapolar a tiempo cero, lo que se demuestra en la figura 7.3 Por consiguiente, usando extrapolación lineal los dos puntos correspondientes a los tiempos más pequeños se usan para obtener la absorbancia a tiempo cero. Este proceso se lleva a cabo para cada longitud de onda lo cual hizo posible obtener el espectro completo a tiempo cero. Esta extrapolación es de gran importancia ya que es imposible obtener directamente toda esta información debido a que el proceso de medición del espectro toma determinado tiempo en realizarse. Este laborioso procedimiento es necesario para poder obtener valores de pKa confiables utilizando la técnica espectroscópica, debido a la inestabilidad de este tipo de moléculas.

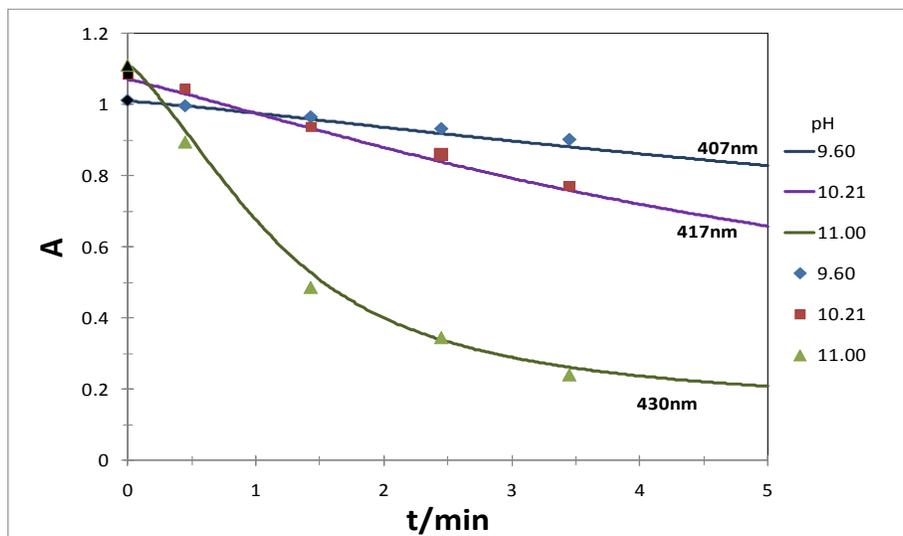


Figura 7.3 Absorbancia en función del tiempo a diferentes valores de pH para Miricetina 5.8×10^{-5} M. Los puntos corresponden a mediciones espectrales, las líneas continuas corresponden a la cinética a una longitud de onda

7.2.1.3 Quercetina

El comportamiento espectral de la Quercetina 2.46×10^{-5} M a $pH = 11.31$ se muestra en la figura 7.4. Inicialmente se observan dos máximos de absorción a 280 nm y 425 nm y una disminución en las intensidades en función del tiempo. Además comienza a aparecer un nuevo pico en 315 nm de descomposición asociado a la oxidación de la misma.⁷⁷ Se observa un comportamiento similar al de la Miricetina pero más estable y sin la aparición de la banda a 650 nm. En intervalos de pH entre 1 y 8 no hay cambios significantes y se considera estable. Pero a $pHs \geq 9.78$ la absorbancia disminuye con una pérdida del 2.3% en 2 min sobre el máximo de absorción. A medida que aumenta el pH la velocidad de descomposición también aumenta (figura 7.5). Por lo cual también se ajustan los espectros a tiempo cero.

En resumen, se encuentra la siguiente tendencia en la estabilidad de los compuestos estudiados Miricetina < Quercetina << Kaempferol << Morina.

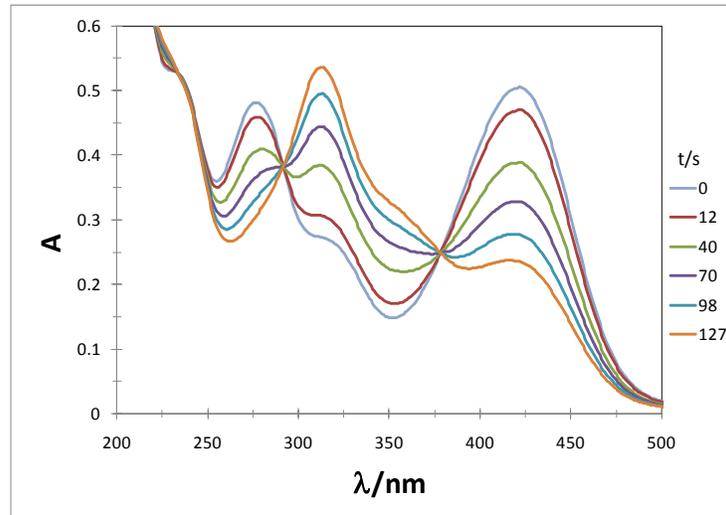


Figura 7.4. Espectros de Quercetina 2.46×10^{-5} M, a varios tiempos a un $pH = 11.31$.

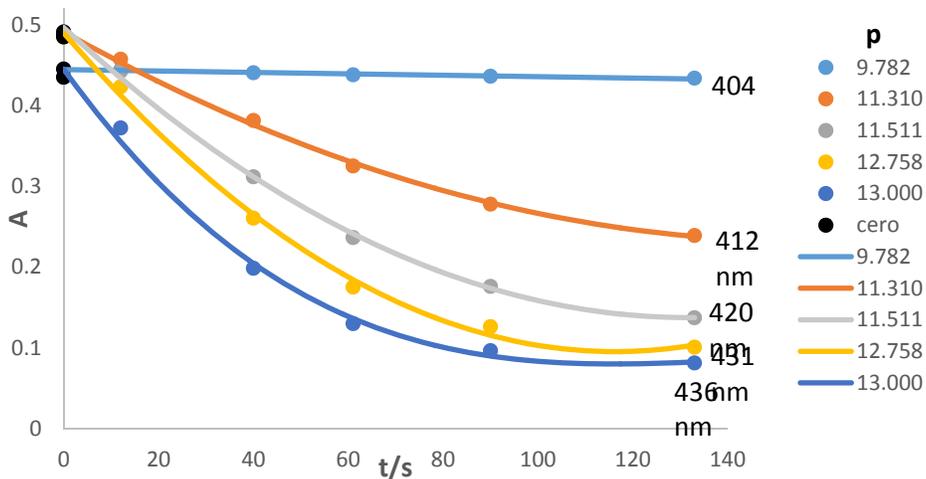


Figura 7.5. Gráfica de absorbancia vs. tiempo, a diferentes valores de pH para Quercetina 2.46×10^{-5} M.

7.3 Determinación de las constantes de acidez

El comportamiento ácido base se determina utilizando espectrofotometría UV/VIS. El Espectro de absorción de la Quercetina (2.46×10^{-5} M), Morina (5.0×10^{-5} M), Miricetina (5.8×10^{-5} M), y de Kaempferol (3.73×10^{-5} M), tomados a diferentes pHs se muestran en la figura 7.6. Los desplazamientos provocados por el incremento en el valor de pH son similares en las 4 sustancias en magnitud y dirección. Es importante insistir en el hecho de que para evitar problemas en las medidas debido a la estabilidad, todas las mediciones se obtienen con

soluciones preparadas en el momento del experimento a cada valor de pH establecido como se describe en la metodología.

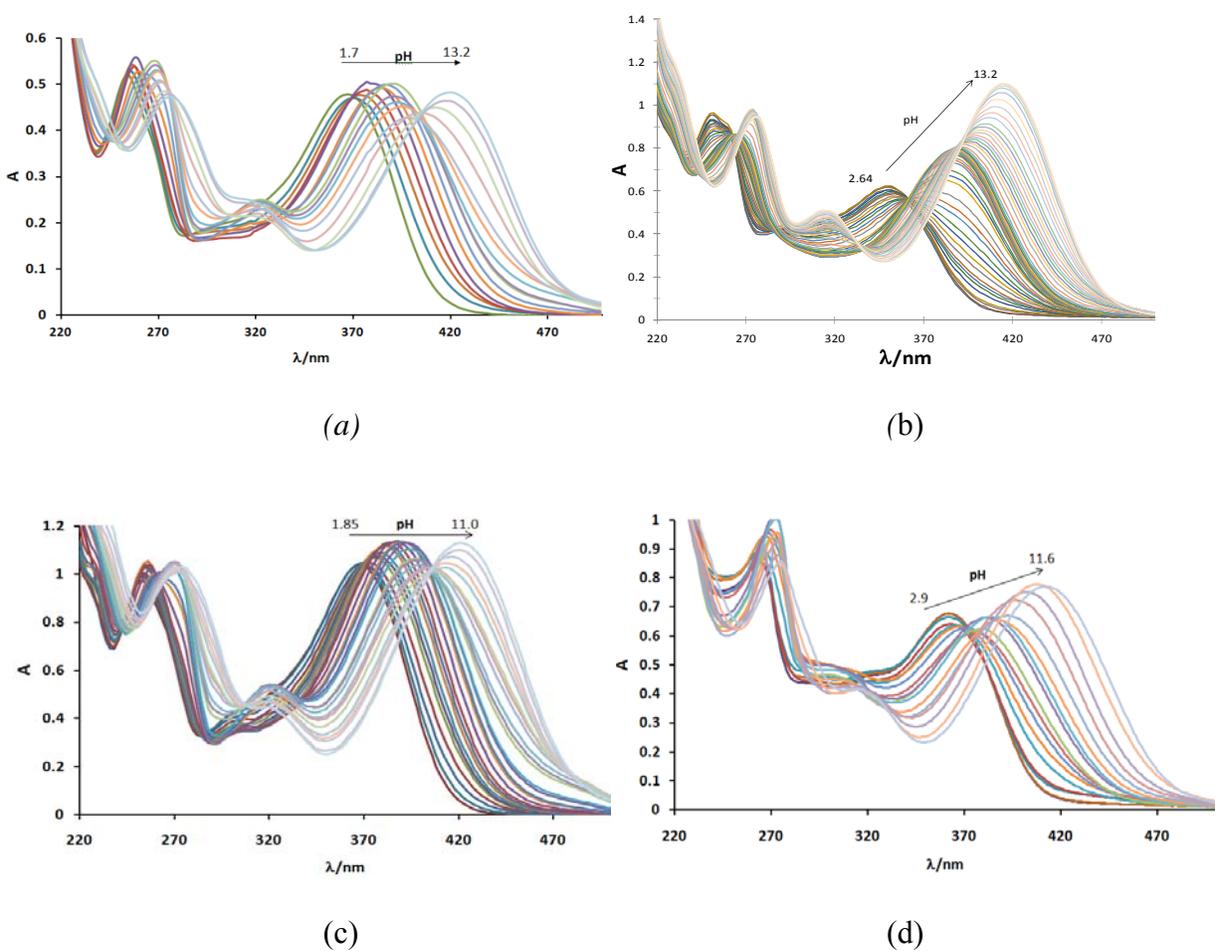


Figura 7.6. Espectros de absorción de Quercetina (a), Morina (b), Miricetina (c), y Kaempferol (d), a diferentes valores de pH.

Se alimentan los datos de absorbancia a cada valor de longitud de onda y pH al programa computacional SQUAD para calcular las constantes de formación globales (β), de donde se obtienen los valores de pKa (tabla 7.2). Para la Miricetina sólo es posible determinar 3 de las 6 constantes de acidez esperadas debido a la inestabilidad de este compuesto en medio básico.

A partir de las constantes de formación y los coeficientes de absorción molar a cada longitud de onda obtenidos por SQUAD es posible calcular el espectro de absorción. Estos se

comparan con los obtenidos experimentalmente para Quercetina, Miricetina Kaempferol y Morina a cada valor de pH, En la figura 7.7 se muestra la excelente correlación que existe entre ellos lo cual asegura la confiabilidad del modelo de constantes propuesto.

Tabla 7.2. Constantes de formación globales (β), valores de pK_a y los valores de desviación estándar (σ) para los 4 compuestos.

	Quercetina			Morina			Miricetina			Kaempferol		
	Log β	σ	pK_a									
H ₁ L	13.04	0.05	13.0	13.22	0.005	13.22	-	-	-	11.63	0.04	11.63
H ₂ L	24.50	0.05	11.46	24.60	0.01	11.38	-	-	-	22.03	0.03	10.40
H ₃ L	34.18	0.05	9.68	34.12	0.02	9.52	-	-	-	30.73	0.03	8.71
H ₄ L	41.62	0.05	7.44	41.85	0.02	7.73	9.65	0.03	9.65	37.95	0.04	7.22
H ₅ L	47.80	0.06	6.18	46.83	0.02	4.98	17.22	0.02	7.57	-	-	-
H ₆ L	-	-	-	-	-	-	23.28	0.01	6.33	-	-	-

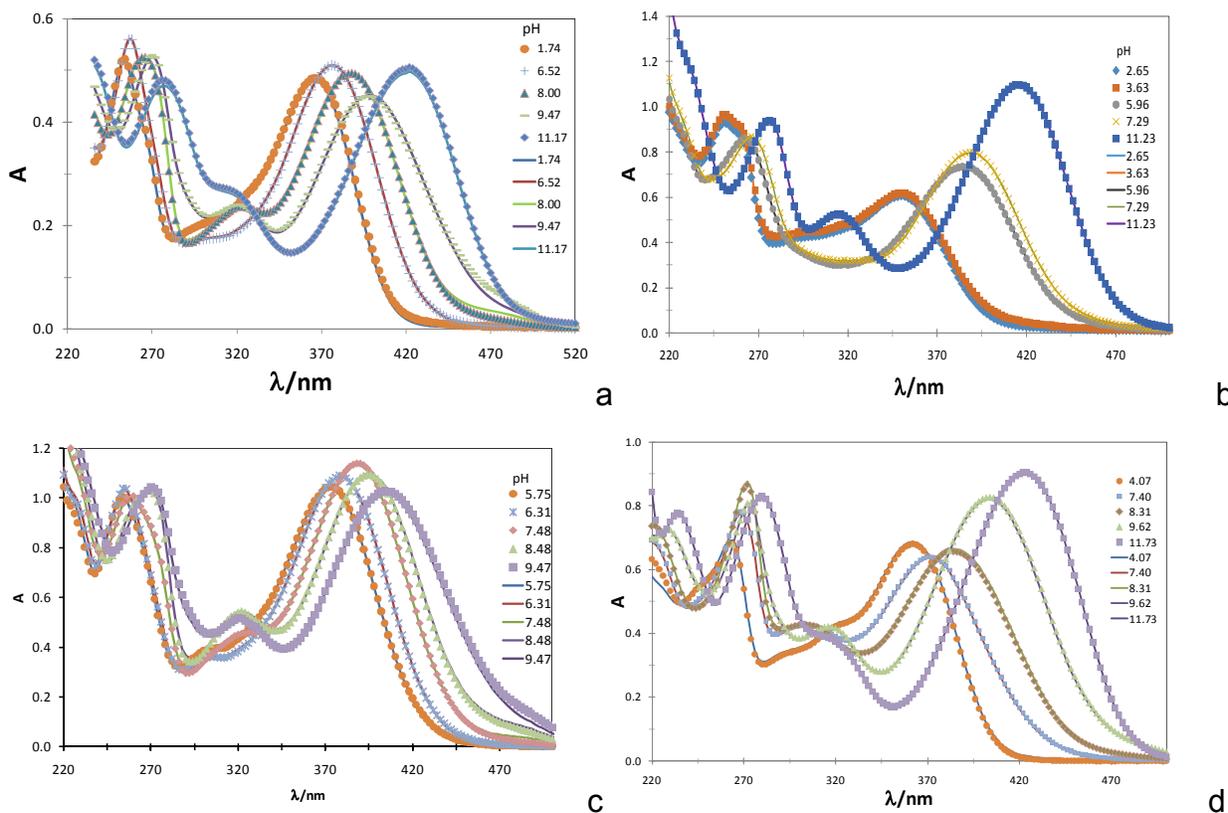


Figura 7.7. Espectros experimentales (puntos) y los generados por SQUAD (líneas), a diferentes valores de pH s, Quercetina (a), Morina (b), Miricetina (c), y Kaempferol (d).

Una aplicación muy útil de saber el conjunto de valores de pKa de una sustancia con muchos grupos ácidos es construir un diagrama de distribución. Este tipo de gráficas permite obtener la fracción molar de cada especie a un determinado valor de pH (figura 7.8). Esto se vuelve relevante particularmente en compuestos que están presentes en la dieta humana. O Aquellos que son consumidos como medicamentos o suplementos alimenticios. En este caso predice por ejemplo que 3 diferentes especies de Quercetina, Morina, Miricetina y Kaempferol se encuentran distribuidas a pH fisiológico (7.4).

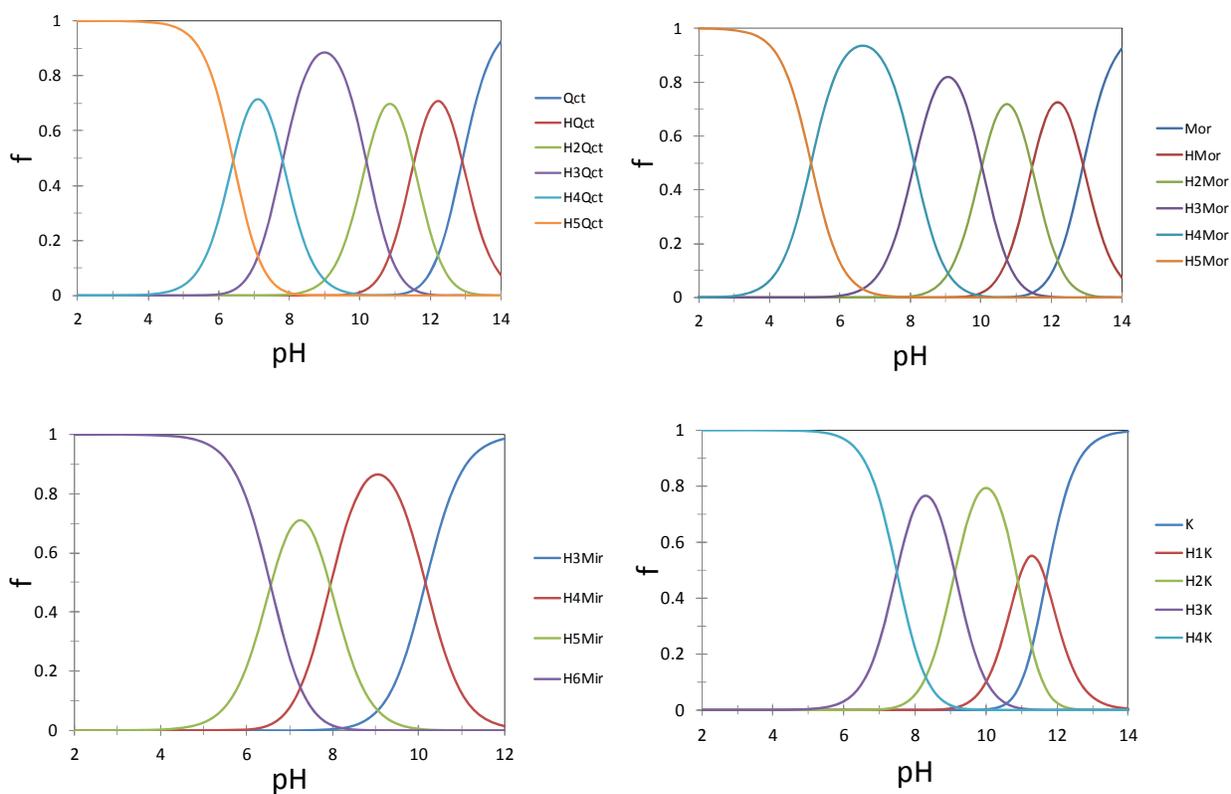


Figura 7.8 Diagramas de distribución de especies para Quercetina (Qct), Morina (Mor), Miricetina (Mir) y Kaempferol (K).

El conjunto de constantes de acidez obtenidas en este trabajo es el más completo hasta la fecha para los cuatros flavonoles. Además de la propuesta de una nueva metodología para obtención de datos experimentales más precisos.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se puede saber la fracción molar para cada una de las especies a un pH específico, sin embargo, no se conoce dentro de la estructura de la molécula el grupo funcional que pierde el protón conforme el pH aumenta. Esta información no es posible obtenerla mediante los estudios espectrofotométricos realizados experimentalmente. Para conocer el orden de desprotonación existen otras estrategias que permiten determinar mediante cálculos teóricos esta información.

8 Estudio teórico del Mecanismo de Desprotonación

8.1 Detalles computacionales

Las optimizaciones de geometría y cálculos frecuencia se calculan utilizando el funcional de la densidad B3LYP y la base 6-31+G(d). Esta optimización se realiza en solución acuosa utilizando el modelo continuo SMD⁷⁸. SMDse considera un modelo de solvatación universal debido a su aplicabilidad para cualquier especie cargada o neutra disuelta en cualquier solvente o medio líquido para los cuales basta conocer unos pocos descriptores.⁷⁸ El método en este trabajo se selecciona después de ser comparado con varios experimentos (ver la siguiente sección). Los estudios conformacionales se orientan a la movilidad del anillo B y la orientación del átomo de H en los grupos fenólicos. Todos los cálculos electrónicos se llevan a cabo utilizando el paquete de programas Gaussian 09.⁷⁹ Los cuales se calculan para el estado estándar 1M.

Las energías libres de Gibbs de reacción correspondientes a todas las desprotonaciones se calculan usando los valores de energías libres de Gibbs del protón en solución acuosa derivadas de estudios experimentales. Esto está basado en el conocimiento de que los métodos computacionales malamente reproducen las energías de solvatación del H⁺ y se ha usado anteriormente con muy buenos resultados.⁸⁰⁻⁸⁶ Hay que destacar de que a pesar de que hay muchos valores reportados para la energía de solvatación del protón en este trabajo se utiliza el valor $\Delta G_{solv}(H^+) = -265.89$ kcal/mol basado en las recomendaciones de Camaioni y Schwerdtfeger.⁸⁷

8.2 Escogiendo la metodología

La metodología utilizada en este trabajo fue escogida después de probar diferentes formas para el cálculo del primer valor de pKa de la Quercetina (6.18). A pesar de que la predicción de valores precisos de pKa de flavonoles no es el objetivo fundamental de la parte computacional de este trabajo es un buen criterio para probar la confiabilidad de la metodología empleada para obtener las energías libres de Gibbs de reacción asociadas con los equilibrios ácido-base



Hay ciertos aspectos que merecen ser mencionados antes de discutir los resultados de las diferentes estrategias. Primero que nada, la estimación de valores precisos de pKas utilizando métodos computacionales sigue siendo en la actualidad una tarea muy difícil.⁸⁸ De hecho un error de dos unidades de pKa calculado con respecto al experimental se considera razonablemente preciso.⁸⁸ Al parecer los principales errores en este sentido provienen del modelo de solvatación. Los modelos dieléctricos continuos (MDC) que son los más usados para el cálculo de valores de pKas en solución acuosa, frecuentemente no son lo suficientemente buenos para sistemas donde las interacciones de corto rango soluto-solvente son importantes. Una forma de afrontar este problema es incluir en el cálculo moléculas de solvente en la proximidad del soluto en vez de usar MDC. Aparte de usar esquemas de reacción que maximizan cancelaciones de error sistemático, se ha demostrado que mejora significativamente la exactitud de los valores pKa calculados.^{85,86,89} El número de posibles esquemas de reacción que se pueden usar para obtener valores de pKa es bastante grande.^{85,86,88} El esquema directo (A) es el de mayor interés para esta investigación. Tiene la desventaja de no conservar el número de especies cargadas en ambos lados del equilibrio, pero la ventaja de que no hay cancelación de errores cuando se calculan las energías de reacción, que frecuentemente conlleva a errores relativamente grandes en los valores de pKas de compuestos fenólicos, especialmente cuando se utilizan ciclos termodinámicos.⁸⁵ Estos ciclos se basan en optimizar la geometría de las moléculas, obtener la frecuencia en el vacío y los efectos del solvente se incluyen a posteriori utilizando las energías libres de Gibbs de solvatación obtenidas de un cálculo de punto simple (PS) usualmente con el modelo continuo PCM.

Teniendo en cuenta toda esta información, se prueban diferentes estrategias para evaluar la importancia de los cálculos en la calidad de los resultados. Se utilizan diferentes bases para los cálculos de energía y frecuencia (+ Freq Opt, Tabla 8.1), así como para mejorar los valores de las energías a través de los cálculos de PS. También se utilizan ciclos termodinámicos (estrategias I al V) en conjunto con el modelo PCM, el cual es el más usado en este caso.; y también una estrategia de “todo en solución” con los métodos de PCM (VI) y SMD (VII) para los efectos del solvente, lo cual significa que todos los cálculos, incluidos los de geometría y

frecuencia se obtienen en solución acuosa. Además 1 o 5 moléculas de agua explícitas se incluyen en las proximidades de los grupos OH. Dentro del enfoque IV, se pone una molécula de agua al lado del sitio de desprotonación; mientras que dentro de enfoque V, se incluyen 5 moléculas de agua explícitas, una por grupo OH en la Quercetina.

Tabla 8.1. Diferentes estrategias probadas para predecir el primer valor de pKa de la Quercetina.

	NMA ^(a)	Opt+Freq		Energía	Efecto Solvente		Error
		Base	Solvente	Base	Metodo	Tipo	pKa _{Teo} - pKa _{Exp}
I	0	6-31G(d)	No	6-31G(d)	PCM	PS	9.00
II	0	6-31G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	PS	4.06
III	0	6-31+G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	PS	3.85
IV	1	6-31+G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	PS	3.50
V	5	6-31+G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	PS	4.45
VI	0	6-31+G(d)	Si	6-31+G(d)	PCM	Todos	4.74
VIa	0	6-31+G(d)	No	6-31+G(d)	PCM	PS	2.94
VII	0	6-31+G(d)	Si	6-31+G(d)	SMD	Todos	0.42
VIIa	0	6-31+G(d)	No	6-31+G(d)	SMD	PS	2.24

^(a) NMA≡ número de moléculas explícitas de agua

Para esta prueba, se tienen en cuenta los cinco posibles sitios de desprotonación. Los valores presentados en la Tabla 8.1 son las que corresponden al sitio de desprotonación que conduce a la más baja energía libre de Gibbs de reacción, ya que se espera que tal camino de desprotonación sea el que contribuya en mayor medida al primer equilibrio ácido-base de la Quercetina.

Todos los métodos que se utilizan predicen que la posición 4a' es el sitio de desprotonación más favorable, es decir, la desprotonación que participa en el primer valor de pKa de la Quercetina. Esto apoya fuertemente la fiabilidad de los cálculos teóricos para evaluar el orden desprotonación de compuestos con más de un equilibrio ácido-base, que es en realidad el principal objetivo de los cálculos realizados en este trabajo.

La estrategia I conduce a los errores más grandes ya que ninguna de las funciones difusas se incluye en el conjunto de base (Tabla 8.1). Las funciones difusas, que tienen pequeños

exponentes, mejoran la descripción de las funciones de onda lejos de los núcleos, y por lo tanto, son cruciales para describir adecuadamente aniones, que tienen grandes distribuciones de densidad de electrones. La inclusión de este tipo de funciones en el conjunto de base, al menos por cálculos de PS para mejorar los valores de energía, reducen los errores de manera significativa con respecto al experimento. Es suficiente incluir funciones difusas para los átomos que no tienen hidrógeno, ya que estos son los que llevan la carga negativa. Esto es importante en el presente trabajo debido a que el tamaño de los compuestos estudiados es grande, y los cálculos son numerosos. Encontrar la estrategia óptima para garantizar resultados confiables a un costo computacional razonable es esencial.

Los errores que surgen del uso de las estrategias II a VI son intermedios y de alrededor de 4 unidades de pKa, sin importar el número de moléculas de agua explícitas y de la inclusión del disolvente durante las optimizaciones de geometría y cálculos de frecuencia. Esto es común en todas las estrategias de III a VI, donde los efectos de solvente se modelan utilizando el método PCM, lo que no parece ser lo suficientemente bueno para el cálculo de valores de pKa cuando se utiliza el esquema directo, lo cual está de acuerdo con varios trabajos previos.^{85,86,88} Sin embargo, el valor de pKa derivado de utilizar el método de SMD, y la misma estrategia, está muy cerca del valor experimental, con un error de 0.4 unidades de pKa, que es significativamente inferior a la exactitud actualmente aceptada para los cálculos de valores de pKa.⁸⁸ Por lo tanto la estrategia VII se ha elegido para llevar a cabo los cálculos de las rutas de desprotonación de los flavonoles que se estudian en este trabajo. Cabe señalar sin embargo, que se espera que el error absoluto de los valores de pKa aumente con el grado de desprotonación, es decir, a medida que la carga de las especies involucradas se hace más negativa.

8.3 Estructuras

El estudio conformacional que involucra la orientación del átomo de H en los grupos OH muestran sistemáticamente que aquellas conformaciones que presentan interacciones con hidrógeno (HB) con el átomo de O en la vecindad de los grupos OH son más bajas en energía. Por lo tanto, son las que se estudian en este trabajo. Respecto a la orientación del anillo B, se realizan los cálculos de rotación variando el ángulo diedro 6'-1'-2-3 (AD) para obtener la

energía potencial de la superficie. Los conformeros identificados como los mínimos globales para cada compuesto en estudio son completamente optimizados y sus estructuras se muestran en la figura 8.1, incluyendo las características geométricas más relevantes. Éstas son las estructuras empleadas para las especies totalmente protonadas a partir de las cuales se modelan las desprotonaciones sucesivas.

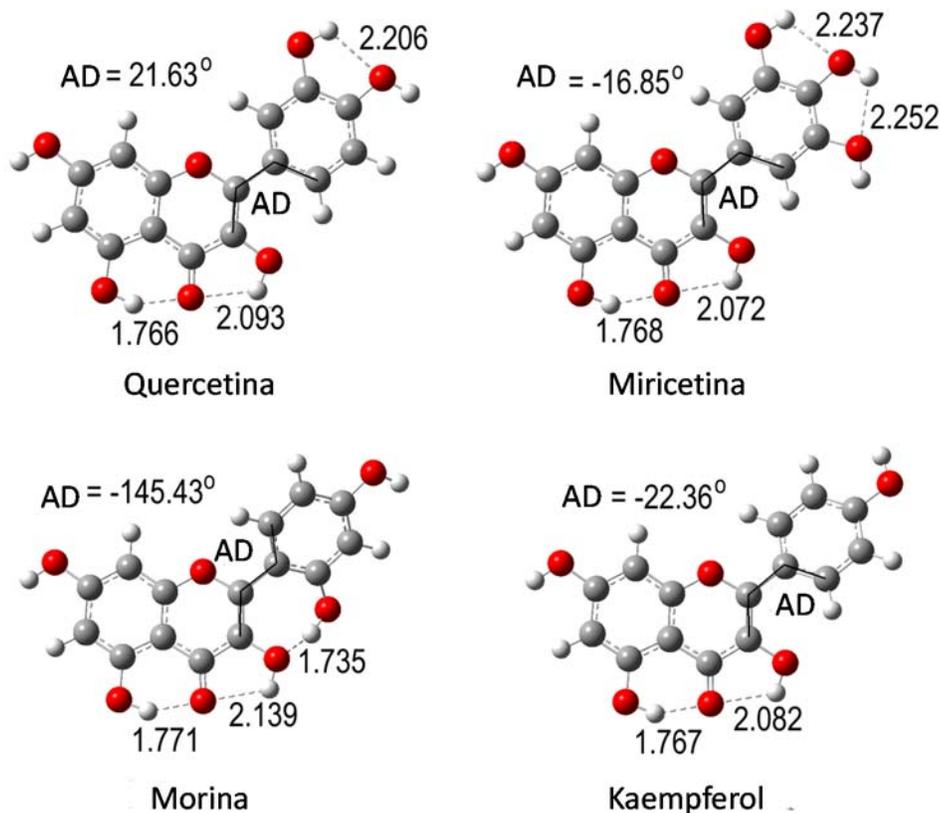


Figura 8.1. Geometrías optimizadas para los cuatro compuestos, las distancias se expresan en Å.

Se encuentra que todos los flavonoides estudiados tienen una estructura prácticamente plana con desviaciones de la planalidad de 21.63°, 16.8°, 34.6°, y 22.4°, para Quercetina, Miricetina, Morina, y Kaempferol, respectivamente. De los compuestos que se estudian, la Morina es la única con un ángulo diedro con una orientación más cercana a s-trans que a un s-cis. Esto se debe, a que es la única molécula con un grupo OH en la vecindad de la posición 1', y el O en el sitio 3a. Se encuentra que esta interacción en particular es la más fuerte de todas las mostradas en la figura 8 con una distancia HB de 1.735 Å. Es probable que esta característica estructural influya en la facilidad de la desprotonación del sitio 2a' en la Morina. La interacción

entre el átomo de O del grupo carbonilo y el H del hidroxilo del sitio 5a es sistemáticamente más fuerte que las que involucran el H del grupo OH en el sitio 3a para la especie neutra. No obstante esta tendencia puede cambiar para los aniones.

8.4 Desprotonaciones

Los flavonoles en estudio contienen varios grupos fenólicos, los cuales se espera que sean susceptibles a desprotonarse. El Kaempferol tiene 4, la Quercetina y la Morina tienen 5 y la Miricetina 6. Todos estos grupos se consideran en el mecanismo de desprotonación. La estrategia elegida para establecer el orden de desprotonación consiste en comparar las energías libres de Gibbs (ΔG) de las posibles reacciones de desprotonación. En la tabla 8.2 se muestran los datos de ΔG donde los resaltados en negro corresponden con la energía más baja y por tanto con la especie asociada a cada valor de pKa

De los flavonoles en estudio la Morina tiene la peculiaridad de tener un primer valor de pKa significativamente más bajo que el resto. Esto se puede explicar basándose en su estructura. Las interacciones intramoleculares por puente de hidrógeno entre el H (2a') y O (3a) debilitan el enlace O-H, lo cual disminuye la energía de desprotonación. Esto se refleja en los valores de ΔG asociados a la primera desprotonación de los compuestos estudiados. Mientras que el ΔG para la primera desprotonación de la Quercetina, Miricetina, y Kaempferol es 9.00, 9.42, y 10.11 kcal/mol, respectivamente; para la Morina este valor es de 4 kcal/mol más bajo (5.33 kcal/mol). Por lo tanto la presencia del grupo OH en el sitio 2' explica el bajo valor de pKa de la Morina. Un comportamiento similar se espera para otros flavonoides con un grupo OH en este sitio o en el sitio 6', ya que esta característica estructural es requerida para la interacción por puente de hidrógeno anteriormente mencionada.

Se encuentra que para flavonoles con al menos dos grupos OH en el anillo B, la primera desprotonación ocurre en este anillo Tabla 8.2. Ya que el caso del Kaempferol el primer sitio de desprotonación es el 7a pero este solo tiene un grupo OH en el anillo B. Para la Quercetina el orden de desprotonación es por los sitios 4a', 7a, 3a, 3a', 5a (figura 8.2). Para Morina y Kaempferol por los sitios 2a', 7a, 4a', 5a, 3a (figura 8.3); y 7a, 4a', 3a, 5a (figura 8.4); respectivamente.

Tabla 8.2 Energías libres de Gibbs (ΔG , en kcal/mol) de reacción de cada posible desprotonación sucesiva en solución acuosa a 298.15 K.

Sitio	Quercetina	Miricetina	Morina	Kaempferol
<i>Primera Desprotonación</i>				
3a	13.52	13.00	5.48	13.48
5a	15.01	14.89	14.67	15.55
7a	9.94	9.93	9.81	10.11
2a'			5.33	
3a'	11.17	14.59		
4a'	9.00	9.42	12.17	12.15
5a'		12.03		
<i>Segunda desprotonación</i>				
3a	16.99	16.00	24.92	15.70
5a	16.86	16.91	19.26	21.31
7a	11.74	11.80	12.04	
3a'	23.40	23.18		
4a'			15.93	13.69
5a'		20.61		
<i>Tercera desprotonación</i>				
3a	19.67	17.53	26.79	19.63
5a	22.30	22.25	24.69	22.84
3a'	24.54	24.41		
4a'			17.16	
5a'		21.34		
<i>Cuarta desprotonación</i>				
3a			31.15	
5a	26.86	27.80	26.23	27.31
3a'	26.09	27.37		
5a'		25.09		
<i>Quinta desprotonación</i>				
3a			28.16	
5a	28.53	28.18		
3a'		31.41		
<i>Sexta desprotonación</i>				
3a'		32.45		

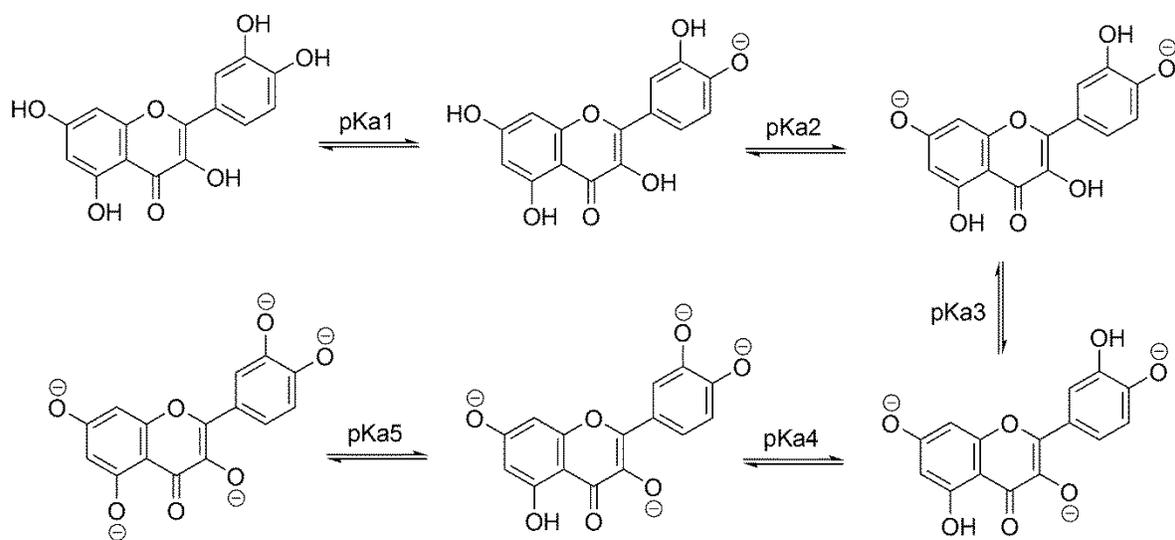


Figura 8.2. Camino de desprotonación para la Quercetina.

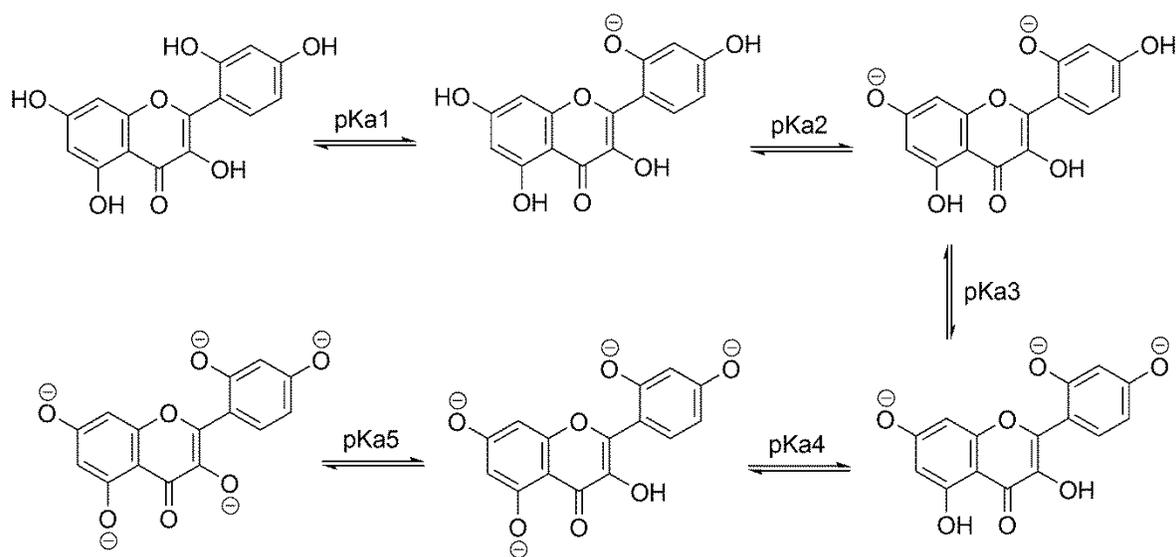


Figura 8.3. Camino de desprotonación para Morina.

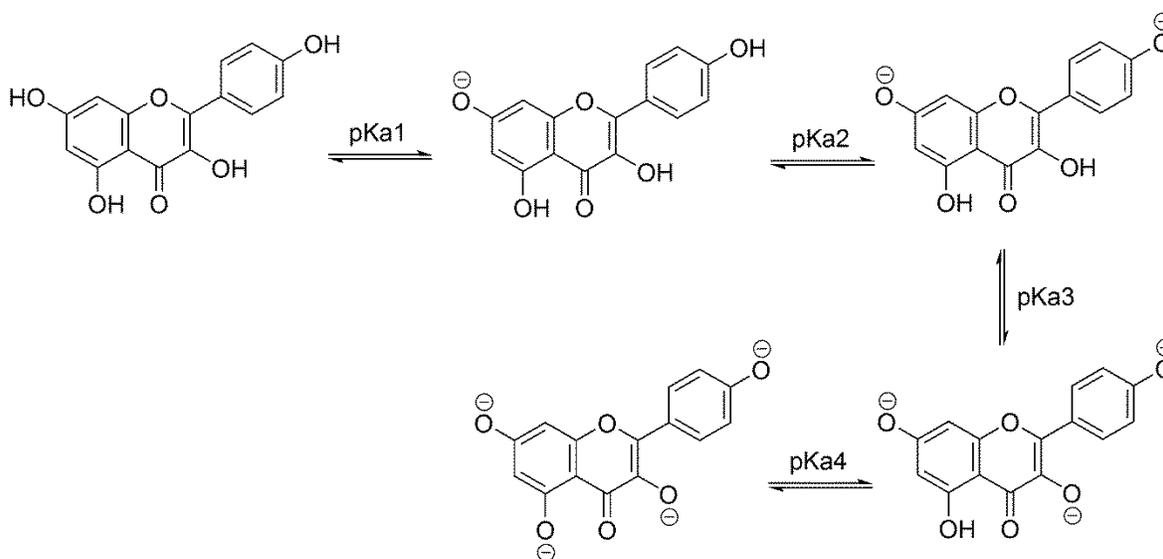


Figura 8.4. Camino de desprotonación para Kaempferol.

Para estos tres flavonoles cada desprotonación está asociada con un valor experimental de pKa, sin embargo para el caso de la Miricetina solo se encuentran tres valores de pKa a pesar de que este compuesto presenta 6 grupos fenólicos. El ΔG asociado a la sexta desprotonación de la Miricetina es más grande que cualquier otro valor calculado de ΔG mientras que el quinto es similar al correspondiente de Quercetina, lo cual indica que el sexto valor de pKa de la Miricetina debe ser más grande que 13.08 que es el valor más alto observado experimentalmente. El orden de desprotonación de la Miricetina queda establecido de la siguiente manera 4a', 7a, 3a, 5a', 5a, 3a' (figura 8.5). Los valores de pKa asociados con las desprotonaciones 5a' (pKa4), 5a (pKa5) y 3a' (pKa6) no se pudieron calcular experimentalmente por la inestabilidad de la molécula.

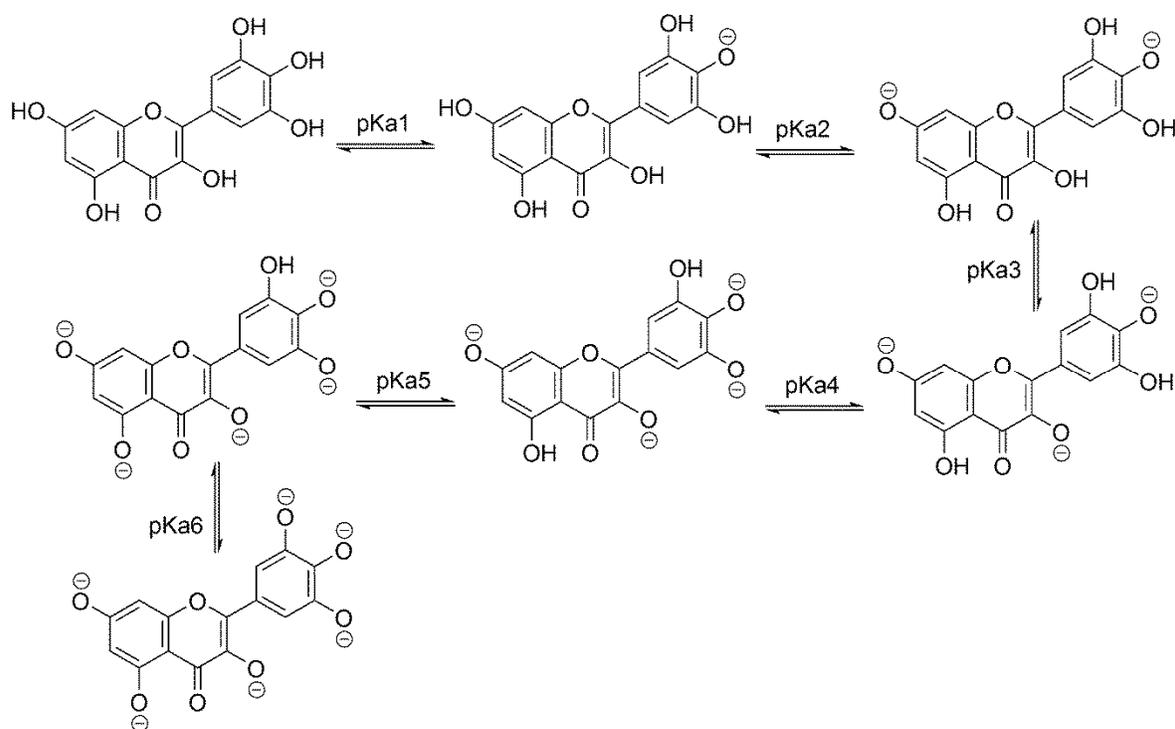


Figura 8.5. Camino de desprotonación de la Miricetina.

Para estimar los posibles cuarto, quinto y sexto valores de pKa de la Miricetina se establece una correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores de ΔG calculados. Se obtiene una correlación lineal excelente (figura 8.6) con un $R^2=0.97$. Usando la expresión de un ajuste lineal los valores de pKa4, pKa5 y pKa6 de la Miricetina se estiman en 11.5, 12.5 y 13.8, respectivamente. Estos valores son mayores que pH 11 y este compuesto no es suficientemente estable a valores de $pH \geq 11$. Esto explica porque solamente los tres primeros valores de pKa se determinan experimentalmente. La correlación que se muestra en la figura 8.9 soporta la confiabilidad de los resultados calculados y valida su aplicación para establecer el orden de desprotonación de los compuestos.

La facilidad relativa de la desprotonación estos compuestos está soportada tanto por la parte experimental como por la teórica. Se analiza, como ejemplo las tres primeras desprotonaciones ya que son las que todos los compuestos tienen en común y de las cuales hay valores experimentales y teóricos. Para la primera desprotonación el orden en los valores de pKa y ΔG es Morina < Quercetina < Miricetina < Kaempferol. Para la segunda desprotonación el orden

queda Quercetina < Miricetina < Morina < Kaempferol. Y para la tercera el orden basado en los valores experimentales queda como Morina < Miricetina < Quercetina < Kaempferol. En este caso en particular los últimos dos están invertidos de acuerdo a los valores calculados de ΔG . No obstante la diferencia en ΔG es muy pequeña (0.04 kcal/mol).

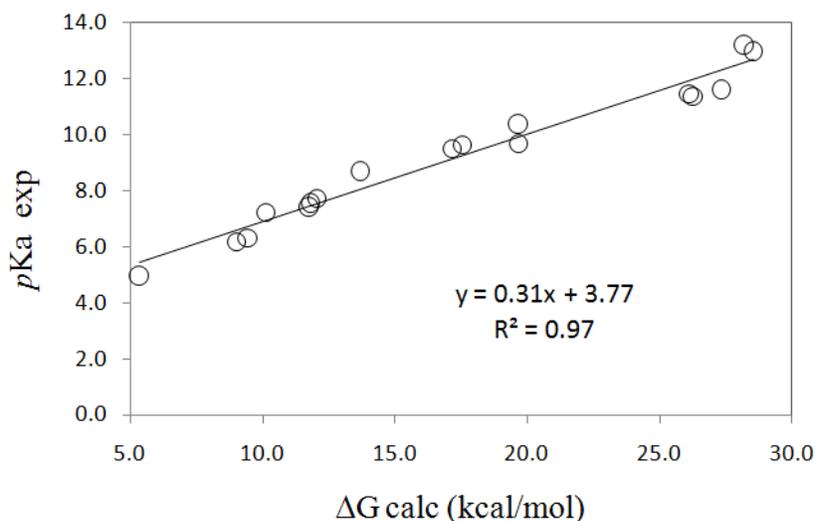


Figura 8.6 Correlación entre los valores de ΔG calculados (kcal/mol) y todos los valores de pKa obtenidos experimentalmente

8.5 Intermediario radicalico de la Miricetina

Como se observa en el apartado anterior los últimos tres valores de pKa de la Miricetina se encuentran en valores de pH mayores a 11.0, y sólo se pueden obtener mediante la correlación de los resultados experimentales y teóricos. Para explicarlo lo que sucede con la Miricetina a valores muy básicos se lleva a cabo el siguiente estudio.

Anteriormente se menciona la aparición de una banda a 650 nm en el espectro de absorción de la Miricetina, cuando el pH es muy básico. En la figura 8.7 se observan dichos espectros, a medida que aumenta el valor pH, la banda de 650 nm se hace más intensa. Se puede observar más a detalle en la figura 8.8 que es una banda que llega a un máximo cuando han transcurrido alrededor de 100 s y después empieza a disminuir. En el mismo tiempo disminuye también la banda a 420 nm y una nueva banda aparece en 320 nm.

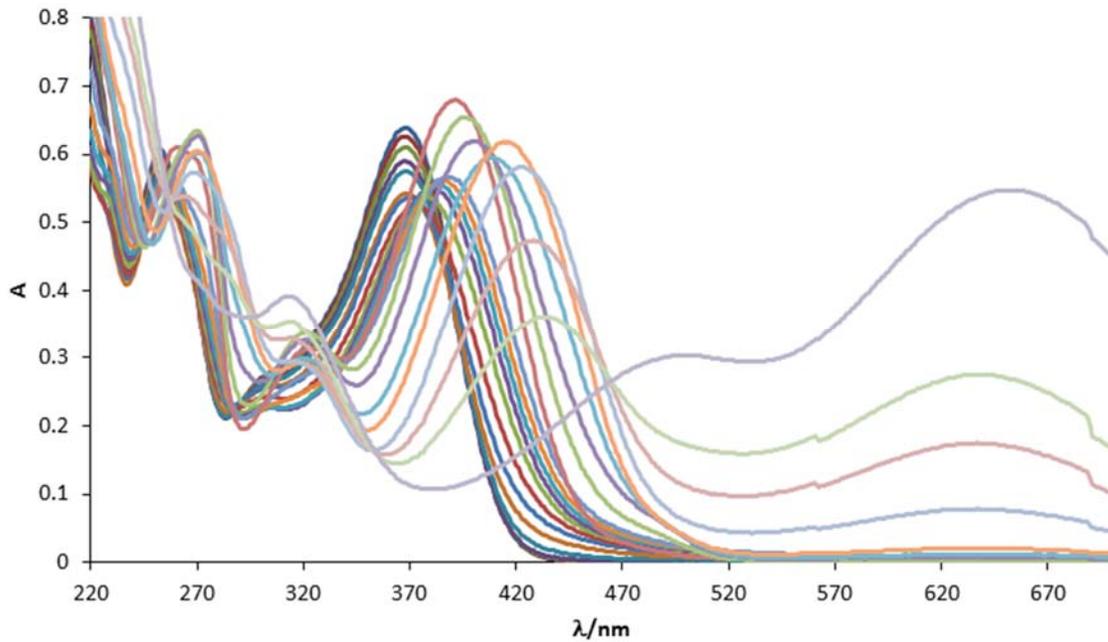


Figura 8.7. Espectros de absorción de Miricetina a diferentes valores de pH de 220 nm a 700 nm

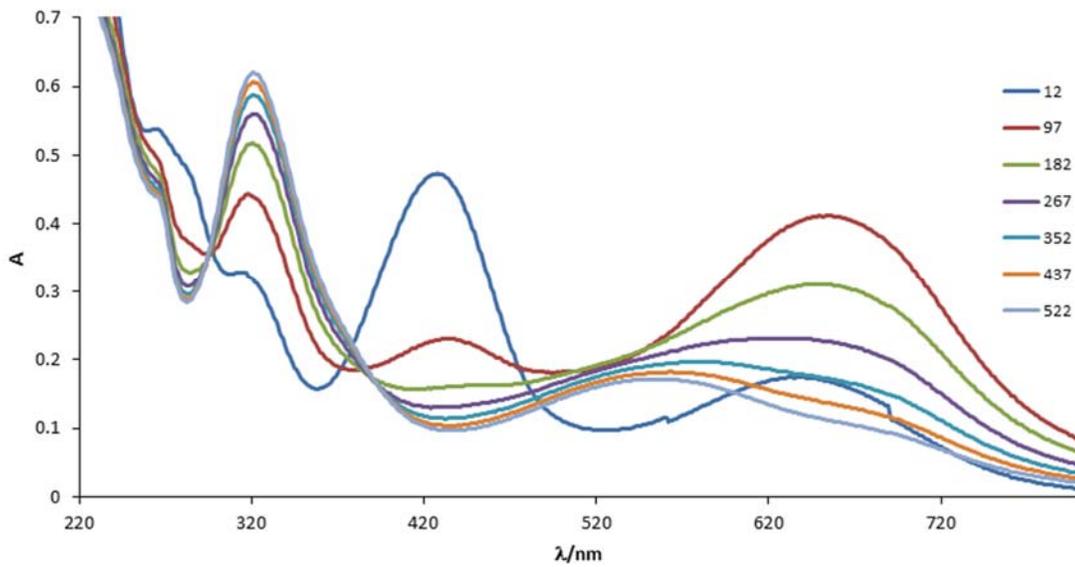


Figura 8.8. Espectros de absorción en el tiempo de la Miricetina 4×10^{-5} M de 220 nm a 800 nm a pH 11

Debido a los cambios observados en la banda de 650 nm se propone la hipótesis de que la Miricetina se oxida a un intermediario radicalico que se forma cuando la molécula comienza a descomponerse lo que ocasiona que sea más inestable y tenga más rutas de reacción. La banda correspondiente a la oxidación de la Miricetina es la que se observa en 320 nm. Para demostrar la existencia del intermediario radicalico se calculan los espectros UV teóricos de cada especie aniónica posible en su forma radicalica y la única que muestra un color en la región del visible fue el radical $[H_2Mir]^{•3}$ que se produce cuando se forma la especie $[H_2Mir]^{4-}$, que es la última constante de acidez que se puede medir experimentalmente. En la figura 8.9 se observa la curva azul (espectro de absorción experimental) y la roja (espectro de absorción teórico) si bien hay una diferencia entre ellos de 70 nm que puede parecer muy grande hay que considerar que el espectro teórico es la contribución pura de la especie radicalica, mientras que el espectro experimental tiene la contribución de todas las especies químicas que se encuentran en ese valor de pH incluyendo la propuesta del radical. Esto explica la desaparición tan rápida de las bandas espectrales de este compuesto cuando se encuentra a valores de pH mayor a 11 y la imposibilidad de medir el resto de las constantes de acidez.

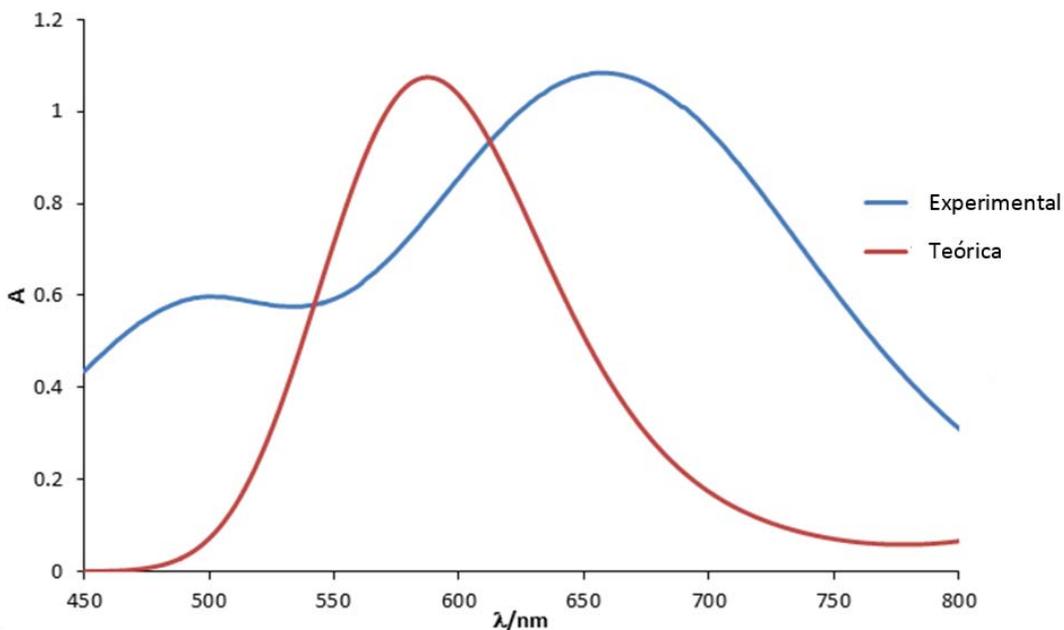


Figura 8.9 Espectro experimental de 450 nm a 800 nm de la Miricetina a pH 11 a los 70 s y espectro teórico del radical $[H_2Mir]^{•3}$

9 Síntesis de puntos cuánticos y su interacción con los flavonoides.

Los Puntos cuánticos son nanoestructuras semiconductoras con gran importancia debido a su óptica extraordinaria y propiedades electrónicas.⁹⁰ Su composición y tamaño le confieren a estos puntos excelentes propiedades ópticas (alta emisión, tamaño controlado y estrechas bandas espectrales).⁹¹ Estas propiedades se pueden modificar controlando el proceso de síntesis, lo que se ve reflejado en la composición y el tamaño de las nanopartículas.^{92,93} Además, poseen una excelente fotoestabilidad (en muchos órdenes de magnitud más grande que los convencionales fluoróforos orgánicos).⁹⁴ Los puntos cuánticos no tienen una solubilidad acuosa intrínseca y por lo tanto su transferencia a la fase acuosa requiere la funcionalización de su superficie con ciertos ligandos, que a su vez sirven como lugares de anclaje para las biomoléculas.⁹⁵ Por lo tanto, se han desarrollado una amplia gama de métodos para conjugar con moléculas biológicas en diversas áreas: etiquetado de células,⁹⁶ el seguimiento de la célula,⁹⁷ de imágenes in vivo,⁹⁸ detección de ADN,⁹⁹ entre otras.

Entre los diferentes nanocristales se encuentran los de sulfuro de cadmio (CdS) de los cuales se ha estudiado la dependencia del tamaño con la fotoluminiscencia,¹⁰⁰ los procedimientos utilizados en la síntesis de estos nanocristales y sus importantes campos de aplicación en diferentes áreas tales como nanomedicina, la optoelectrónica, energía solar, etc.^{101,102}

La síntesis de nanocristales de CdS normalmente se realiza en disolventes orgánicos con el fin de controlar su velocidad de crecimiento y la dispersión de los mismos, pero este método tiene algunas limitaciones, ya que los puntos cuánticos en fase orgánica no pueden ser utilizados en aplicaciones biológicas debido a su naturaleza hidrofóbica. Por lo tanto, se debe hacer una transferencia a la fase acuosa para que resulten biocompatibles, pero en este proceso se pierde gran parte de la fotoluminiscencia de las nanopartículas. A pesar del éxito en la ruta de síntesis orgánica algunos han desarrollado alternativas para la preparación de puntos cuánticos de CdS utilizando medios acuosos.¹⁰³ En comparación, la síntesis en medio acuoso es mucho menos costosa, más segura y directamente biocompatible.

Actualmente existe un gran interés en proponer nuevos avances en los procedimientos destinados a la síntesis de alta calidad de nanocristales de CdS. Hasta la fecha, la mayoría de los métodos que utilizan medios acuosos han resultado en un bajo rendimiento de síntesis,

o lo que es lo mismo baja fluorescencia.¹⁰⁴ Además en muchos de estos procedimientos, no existe información clara en los estudios con respecto a las características de las nanopartículas obtenidas, las variables involucradas en el proceso de fabricación así como la estabilidad y reproducibilidad de los mismos.

En vista de las posibles aplicaciones de las nanopartículas de CdS en este campo, se realiza un estudio de síntesis de CdS. Se caracterizan las nanopartículas de manera óptica, con microscopía de transmisión de electrones y electroquímica. Para poner en evidencia la interacción de los flavonoides con estas nanopartículas.

9.1 Metodología

9.1.1 Síntesis de nanopartículas de CdS

La síntesis se lleva a cabo mezclando la cantidad deseada de una solución de cloruro de cadmio con ácido mercaptoacético MAA, se ajusta el pH, la temperatura y se le añade una solución de sulfuro de sodio preparada al instante para evitar la descomposición, bajo agitación constante y atmósfera de nitrógeno. A las 24 horas de agitación se da por terminada la síntesis. Toda el agua utilizada es desionizada y burbujeada con nitrógeno previamente. Las concentraciones de cloruro de cadmio, ácido mercaptoacético y sulfuro de sodio son variables en cada síntesis, así como el pH y la temperatura para encontrar un óptimo valor de fluorescencia y tamaño de las nanopartículas.

9.1.2 Tratamiento y Caracterización de las nanopartículas:

Primero se centrifugan en Acetona en una relación de 1/3 CdS/Acetona (v/v), a 0 °C por 15 min y se redisuelven en agua desionizada.

Microscopio de Transmisión de Electrones TEM: Se toman 50 uL de la solución de Puntos Cuánticos se deja secar la muestra por media hora y se analizan en un Microscopio de transmisión de electrones EM-2011(Jeol,Ltd., Japón)

Electroquímica: Se toman diferentes volúmenes de la solución de nanopartículas de CdS, se pone en un amortiguador de acetatos 0.2M a pH 5 en un volumen final de 1.5 mL y se agregan 50 uL en un electrodo de SPE. Utilizando voltamperometría de onda cuadrada con un potencial

de acondicionamiento de -0.15 V por 30 s, Potencial de depósito -1.1 V por 120 s. El mismo procedimiento se hace en un chip fabricado con un electrodo de SPE con un monocanal híbrido de PDMS de 50 μM de diámetro. Las mediciones se hacen en un Potenciostato Galvanostato Autolab 20.

Fluorescencia. Se toman las soluciones de las diferentes síntesis de CdS y se obtiene el espectro de emisión excitando a 380nm en una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico en un fluorómetro Perkin Elmer. Previamente se hace un barrido de longitudes de onda para obtener la longitud de onda de excitación que en este caso es de 380 nm.

9.1.3 Inhibición de fluorescencia de CdS

Se determina el espectro de emisión de las nanopartículas de CdS excitando a 380nm, para ello se agregan 200 μL en un volumen final de amortiguador de fosfatos de 2 mL a un valor de pH de 7.4 y se toma como referencia. Posteriormente se agrega el compuesto a determinar en una concentración final 5×10^{-5} M y se observan los cambios, ya sea con el flavonoide o con cualquier sustancia que pueda causar interacción para analizar la selectividad del método.

Además cambiando las concentraciones se obtienen las curvas de calibración para diferentes compuestos.

9.2 Resultados y discusión

9.2.1 Síntesis de Nanopartículas de sulfuro de cadmio

Debido a que el Cd^{2+} , S^{2-} , y el MAA son las tres principales especies involucradas en la formación de los CdS es importante encontrar una relación óptima entre ellas, además del pH y la temperatura de síntesis. Es por ello que se realizan varias síntesis cambiando las relaciones Cd/S y Cd/MAA, pH y temperatura. A continuación se muestra la tabla 9.1 con los parámetros utilizados de algunas de las síntesis que se llevaron a cabo. Las síntesis que se llevan a cabo se etiquetan de S1 a S9 y San1 a San4, en la tabla solo se muestra la composición de las más relevantes.

Tabla 9.1. Parámetros utilizados en las diferentes síntesis de CdS

	S2	S3	S4	S6	San2	S7	S8	S9
					&San3			
Cd/MAA	0.1	0.1	0.15	0.1	1	0.15	1.16	1.26
Cd/S	1.0	1.0	1.0*	1.0	2	2.0	2.19*	2.29
pH 3er paso	4.7	4.78	7.0	7.0	11	7.9	10.15	7.68
Temperatura	TA	TA	TA	TA	TA	TA	35	35

- * Se añadió Na₂S gota a gota TA= Temperatura ambiente

9.2.2 Caracterización

9.2.2.1 Fluorométrica

Uno de los factores que se tiene en cuenta es la evolución en el tiempo del máximo de emisión. La Figura 9.1 muestra la variación de la intensidad de fluorescencia en un máximo de 72 horas, para 3 síntesis diferentes. Las 3 son inestables y están en constante cambio y una de ellas San3 comienza a disminuir su intensidad a partir de 48 horas. Estas tres fueron las más fluorescentes desde el inicio y las únicas que se monitorearon hasta las 72 horas, es por ello que no se muestran datos del resto de las síntesis, ya que el objetivo es obtener un buen rendimiento cuántico.

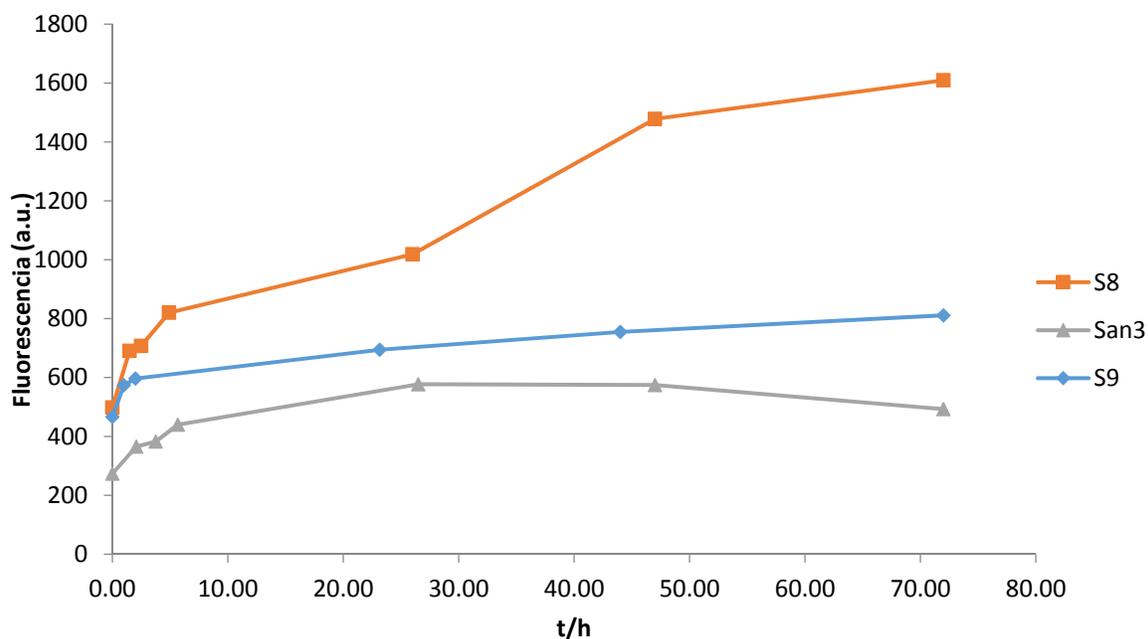


Figura 9.1. Evolución de la fluorescencia de las nanopartículas de CdS

En la figura 9.2 se pueden observar los espectros de emisión para las diferentes síntesis, todas son excitadas a 380nm. Se pueden apreciar las diferentes intensidades de fluorescencia y los cambios en la longitud de onda del máximo de emisión: a mayor longitud de onda, mayor el tamaño de la nanopartícula. S4, San3 y San2 son por la reproducción de las síntesis obtenidas de la literatura mientras que las demás se obtuvieron modificando algunos de los parámetros más relevantes de la síntesis. Se puede observar como S8 es significativamente más fluorescente que las reportadas en la literatura y también con la menor longitud de onda de emisión.

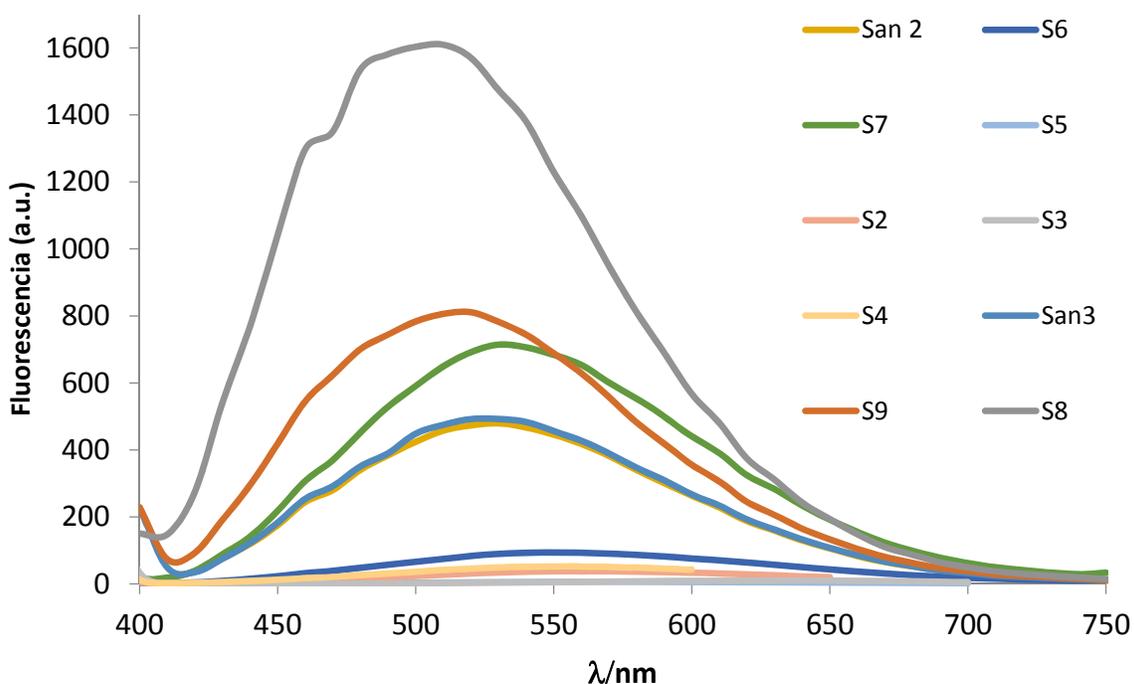


Figura 9.2. Espectros de fluorescencia de algunas de las síntesis de CdS

9.2.2.2 Microscopía de transmisión de electrones.

Para tener una caracterización de las nanopartículas es imprescindible observarlas en el microscopio de transmisión de electrones (TEM). La figura 9.3 muestra las imágenes de la síntesis S8. Se pueden ver los planos cristalinos correspondientes a los puntos cuánticos de CdS, hay una buena dispersión y el tamaño de la nanopartícula es de alrededor de los 2.5 nm.

Se caracteriza también la síntesis S7 en la cual se puede observar la formación de agregados esféricos de alrededor de 100-200 nm de diámetro (figura 9.4 a y b) La esfera esta compuesta por miles de nanopartículas figura 9.4 c, además en la perifería de la esfera también se observan puntos cuánticos monodispersos figura 9.4 d, el tamaño de los mismos es un poco más grande que S8 alrededor de los 4 nm, esto explica la diferencia en la longitud de onda de emisión. La diferencia entre esta síntesis y S8 es una alta concentración de MAA, aparentemente es el responsable de formar estos agregados esféricos y aumentar el tamaño de las nanopartículas.

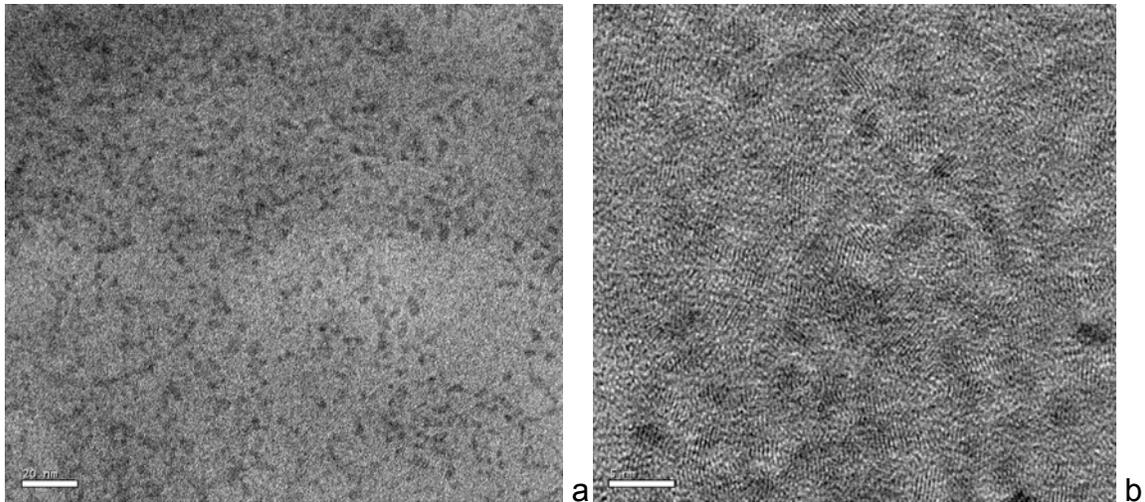


Figura 9.3. Imágenes de TEM de la síntesis S8, a: A escala de 20 nm, b: acercamiento a 5 nm.

Después de analizar los espectros de fluorescencia y sus intensidades con respecto a las relaciones Cd/S, una relación de 1 provoca que prácticamente no se formen puntos cuánticos, el exceso de sulfuro causa resultados negativos. Cuando la relación es de 2 hay un buen rendimiento de síntesis y a medida que se disminuye un poco más la cantidad de sulfuro de sodio aumenta la fluorescencia disminuyendo también el tamaño de las nanopartículas, hasta un óptimo de 2.19 la relación de Cd/S (S8) y comienza a perder rendimiento cuando la relación es de 2.29 (S9). Mientras más pequeña la relación Cd/MAA, se produce la formación de agregados esféricos uniformes y un tamaño relativamente mayor de los nanocristales, al aumentar esta relación, los cristales se hacen más dispersos y disminuye el tamaño de las nanopartículas. El pH es un factor muy importante que no se puede pasar por alto, ya que a valores de pH 7 en adelante hace posible la formación estable de las nanopartículas, esto se atribuye a la formación de un complejo entre el MAA y el Cd. Además valores bajos de pH provocan la descomposición del sulfuro de sodio a sulfuro de hidrógeno y por tanto impide la formación de los puntos cuánticos.

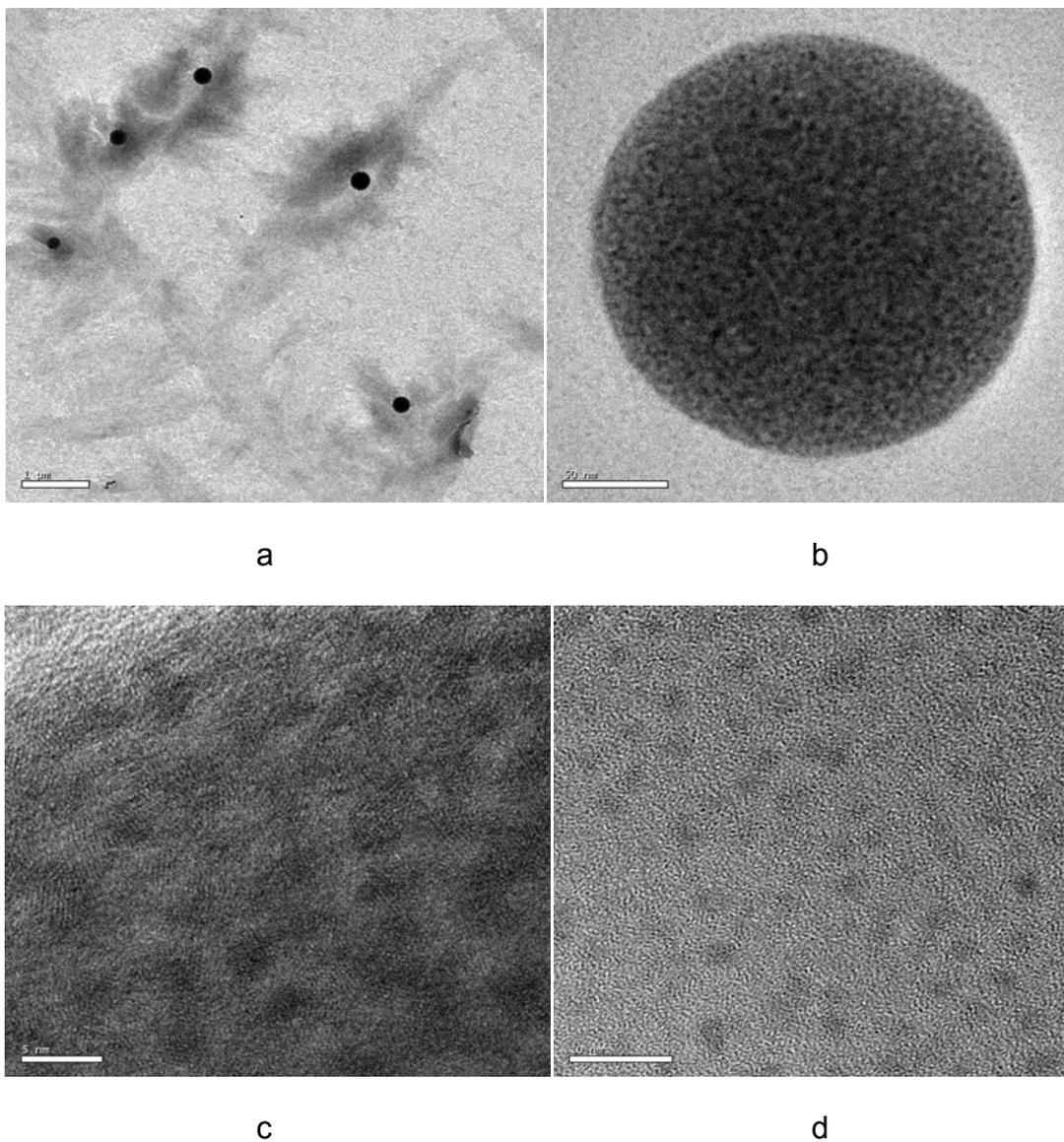


Figura 9.4. Imágenes de TEM de las síntesis S7, a: escala 1μm formación de agregados esféricos, b: acercamiento a 50 nm de una de las esferas, c: sobre la esfera a 5 nm la escala, d: en la periferia de la esfera a 10 nm.

9.2.2.3 Electroquímica

9.2.2.3.1 Resultados electroquímicos (gota)

Se utiliza Voltamperometría de onda cuadrada, para la determinación de las diferentes concentraciones de CdS siguiendo la corriente de la reducción de Cd(II) a Cd(0) sobre el

electrodo SPE a varias condiciones: rompiendo los CdS con HCl 1 M , se mediría directamente la cantidad de Cd²⁺ en la solución y compararla cuando está en presencia una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M donde todavía permanecen íntegros los CdS.

La figura 9.5 muestra los resultados en HCl para varias concentraciones de CdS mediante la técnica de Voltamperometría de onda cuadrada, utilizando un electrodo SPE, agregándole una gota de 50 uL. Se puede observar como al aumentar la concentración de CdS aumenta la corriente de pico pero también se desplaza el potencial de oxidación del Cd²⁺ sobre el electrodo.

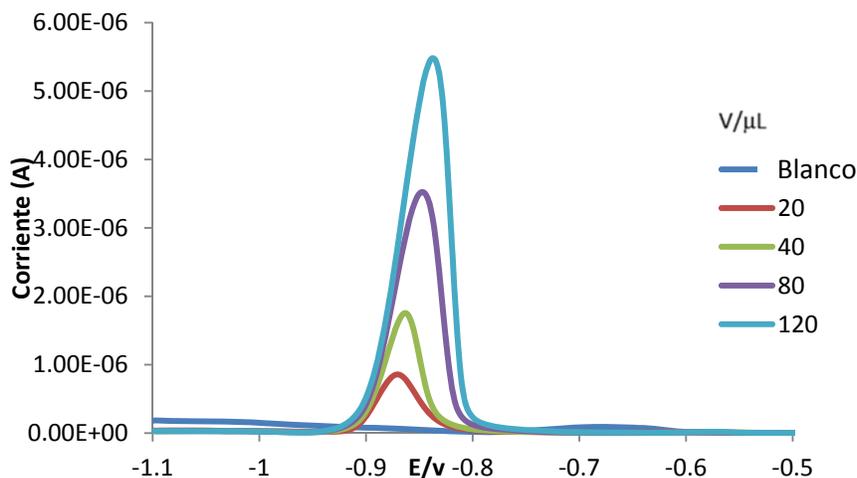
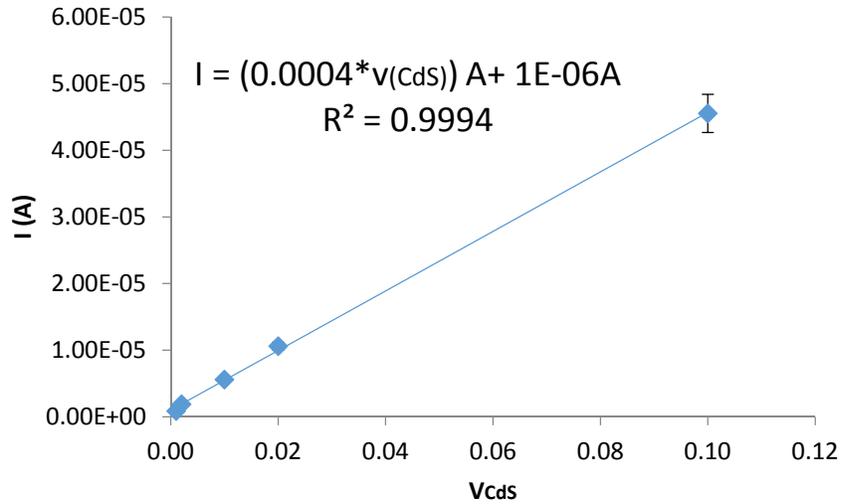
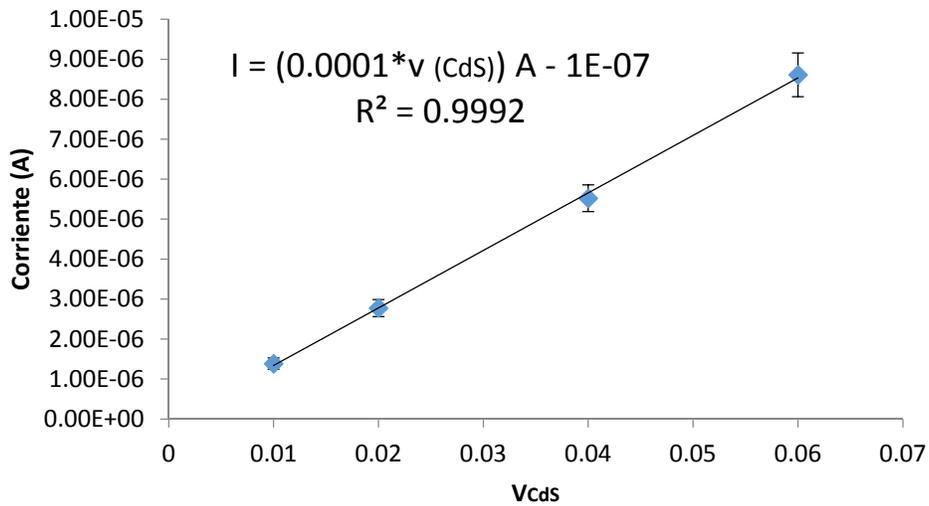


Figura 9.5 Voltamperometría de onda cuadrada de los CdS a diferentes concentraciones en HCl en electrodo SPE

En la figura 9.6 se muestran las curvas de calibración correspondientes en HCl y en amortiguador de acetatos a pH 5.5 0.2 M. Como es de esperarse, la corriente es más grande en HCl, no obstante también es medible en el amortiguador de acetatos obteniéndose una buena correlación. Este estudio es importante para aplicarlo por ejemplo a conjugación de CdS con anticuerpos en una prueba de Elisa.



(a)



(b)

Figura 9.6. Curva de Calibración en HCl (a) y en amortiguador de acetatos 0.2M (b), de la voltamperometría de onda cuadrada de los CdS

9.2.2.3.2 Caracterización en Chip

También se realiza el mismo procedimiento pero utilizando un CHIP hecho en el laboratorio de PDMS con un microcanal Híbrido de $500 \mu\text{m}$ de espesor, en amortiguador de acetatos.

Se observa en la figura 9.7 y 9.8 como la corriente es mucho mayor que en el experimento en gota, esto es debido a que hay un flujo establecido en el canal mientras transcurre el tiempo de depósito.

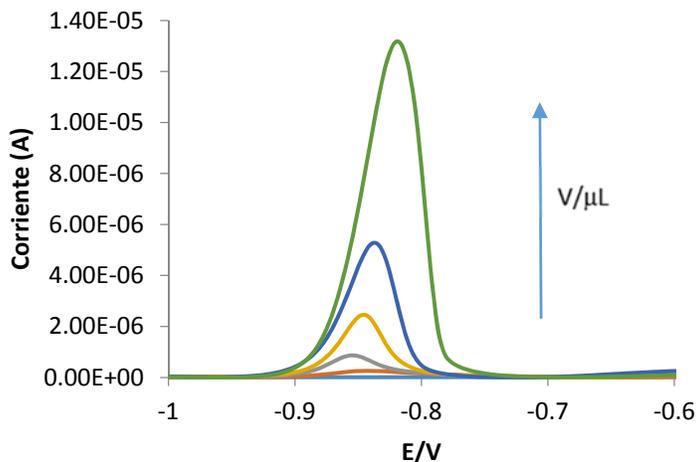


Figura 9.7. Voltamperometría de onda cuadrada de los CdS a diferentes concentraciones en amortiguador de acetatos

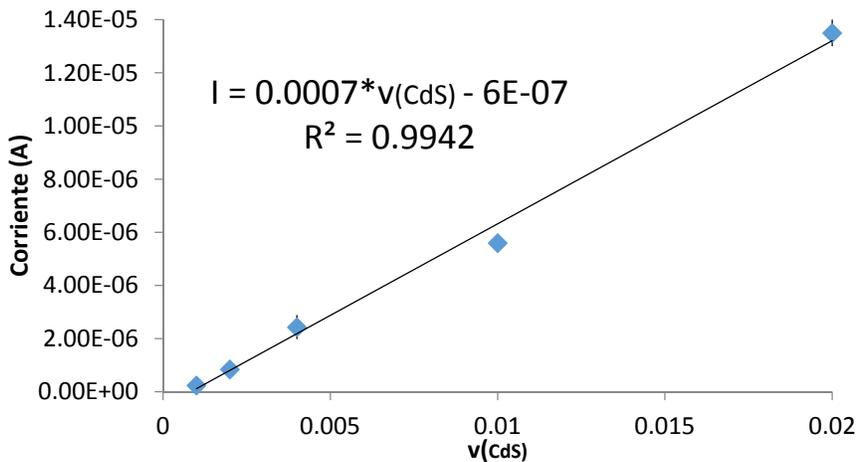


Figura 9.8. Curva de Calibración en amortiguador de acetatos 0.2M (b), de la voltamperometría de onda cuadrada de los CdS

Hay que destacar que en esta sección no se busca hacer un estudio exhaustivo de todos los parámetros que influyen en el procedimiento de síntesis porque habría que hacer demasiados experimentos para controlar todas las variables adecuadamente. Solo se modifican algunos parámetros para tener una idea de cómo lograr un buen rendimiento en los CdS y darles aplicación. Lamentablemente se confirma una vez más que la síntesis de puntos cuánticos en medio acuoso no es reproducible, en términos de intensidad de fluorescencia y que es un proceso dinámico que está en constante cambio, incluso después de haber “terminado” la síntesis y almacenarlo a 4 °C en ausencia de luz, se observan cambios en la luminiscencia, pH e incluso el tamaño de las nanopartículas, transcurrido el tiempo (semanas). La limpieza del material es muy importante para la síntesis, en algunos casos no se obtiene rendimiento alguno si no se limpia con agua regia todo el material y/o con persulfato de amonio.

No obstante puede ser utilizado para hacer estudios cuantitativos, ya que los resultados con varias curvas de calibración (obtenidas para cada una de la síntesis de las nanopartículas) son reproducibles, cada síntesis mantiene sus propiedades de fluorescencia mientras dura el experimento y solo hay que medir la fluorescencia inicial y establecer esa medición como referencia.

9.2.3 Uso de CdS en la determinación de Flavonoides

Al hacer las primeras pruebas, solo es necesario poner en contacto una solución de alguno de los flavonoides con la solución de puntos cuánticos y se observa una disminución en la fluorescencia, particularmente la primera prueba se hace con una solución de Quercetina. Se mide la fluorescencia de 200uL de CdS en un amortiguador de fosfatos con valor de pH 7.0.1 M y al agregar Quercetina a una concentración final de 0.01 mM, se observa una disminución considerable en la fluorescencia (figura 9.9)

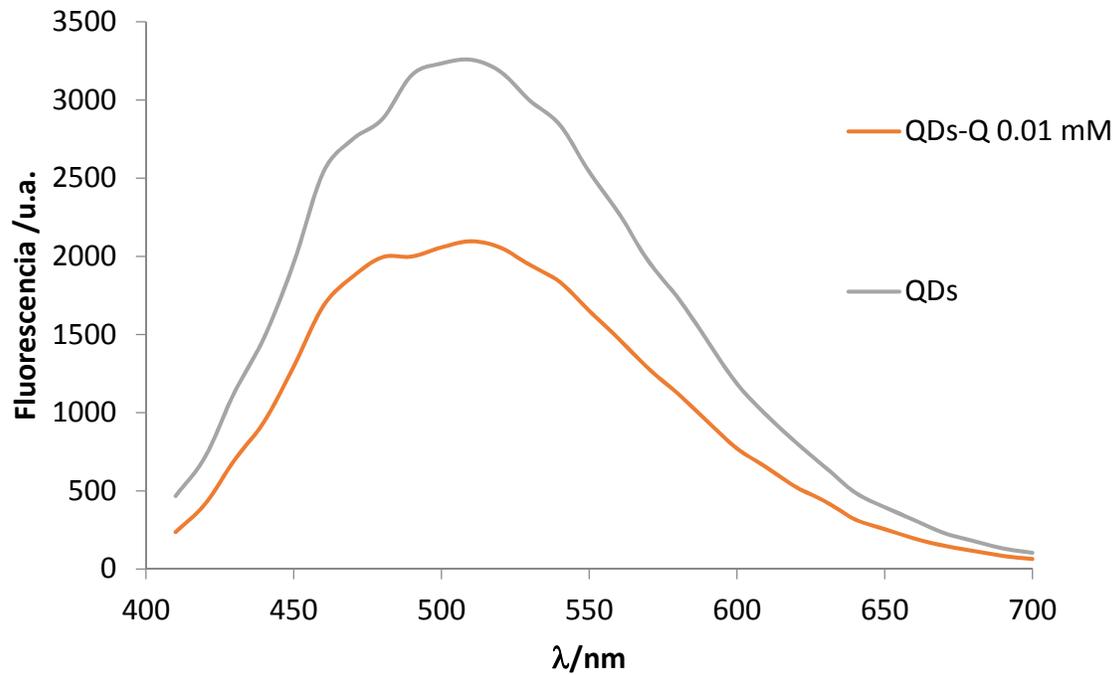
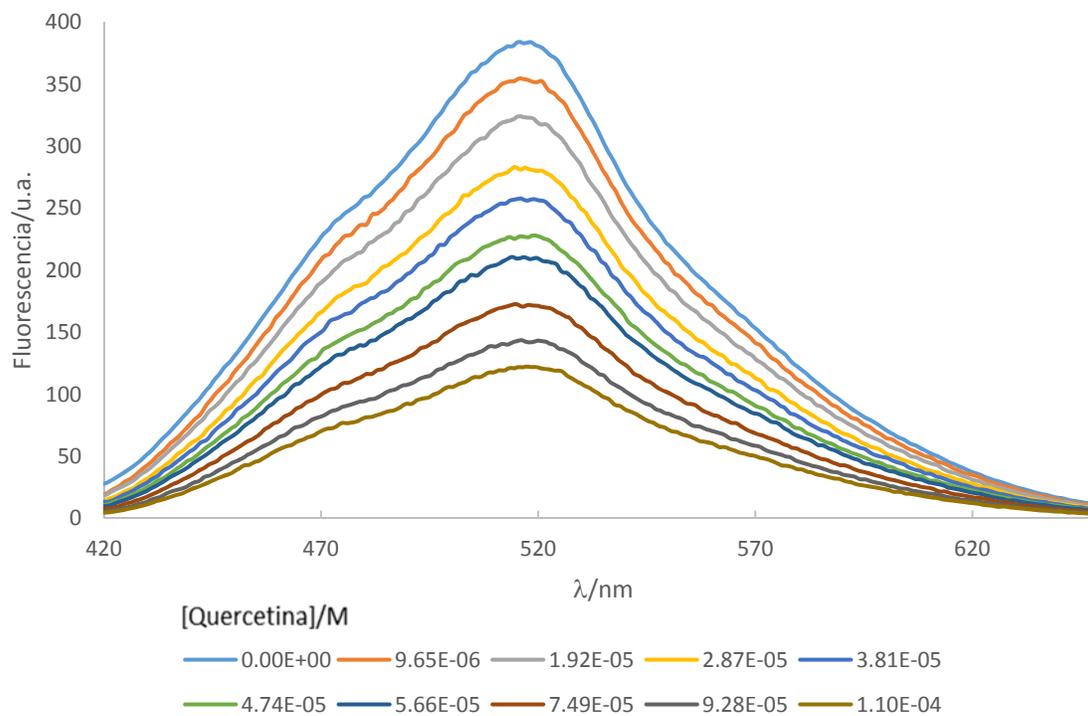
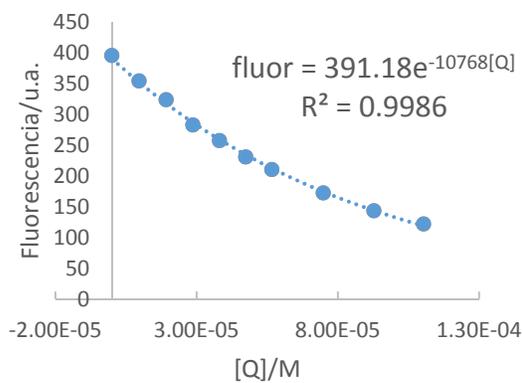


Figura 9.9. Espectro de fluorescencia de los CdS con y sin presencia de Quercetina

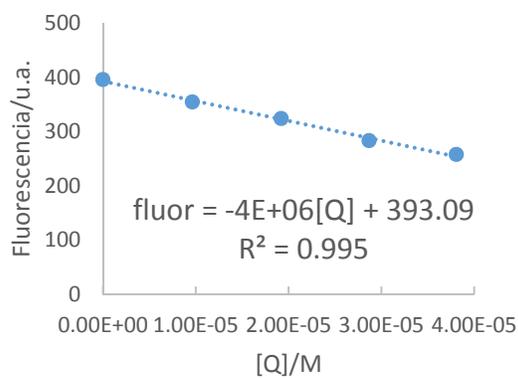
El siguiente paso sería ver la dependencia de la fluorescencia con la concentración por lo que se hace una curva de calibración. En la figura 9.10a se muestran los espectros de emisión a diferentes concentraciones, de las cuales se toma el máximo de emisión y se grafica en función de la concentración (figura 9.10b). Se observa una dependencia no lineal si se toma todo el intervalo de concentraciones realizado en el experimento, por lo que se reducen los puntos para concentraciones más bajas de Quercetina con el objetivo de obtener una tendencia lineal (figura 9.10c).



(a)



(b)



(c)

Figura 9.10 Espectros de emisión de la Quercetina a varias concentraciones en presencia de CdS (a) curva de calibración exponencial de 0 a 1.1×10^{-4} M de Quercetina (b) y curva de calibración lineal de 0 a 3.80×10^{-5} M (c)

Se obtienen también las correspondientes curvas de calibración para los sistemas con Miricetina, Kaempferol y Morina (los resultados se muestran en el anexo 4 figuras A1, A2, A3).

Se obtienen resultados similares pero con cambios en la pendiente, lo que demuestra una dependencia con la naturaleza del compuesto. Esto se discute en la sección 9.2.5.

La selectividad se convierte en una prioridad una vez demostrado que el sistema funciona, por lo que se prueban moléculas similares que posean anillos fenólicos, otras con grupos amino que se pueden acoplar con los grupos carboxilo, que presentan los CdS en su superficie, además de algunas otras que pueden estar presentes junto con los flavonoides en muestras reales como por ejemplo el ácido ascórbico.

9.2.4 Inhibición de Fluorescencia

La figura 9.11 muestra espectros de fluorescencia de los CdS solos y en presencia de varios compuestos. En el primer experimento de prueba que se hace casi al azar, utilizando algunas sustancias con propiedades similares, o muy diferentes que se encuentran en el laboratorio, y otras que podían interferir. Como por ejemplo el ácido ascórbico puede ser un interferente ya que se encuentra en las frutas, donde están presentes los flavonoides. Se observa que solo la parabenzocquinona hace que aumente la fluorescencia, mientras que el resto de las moléculas no provoca ningún cambio, excepto la Curcumina que la inhibe de igual forma que la Quercetina.

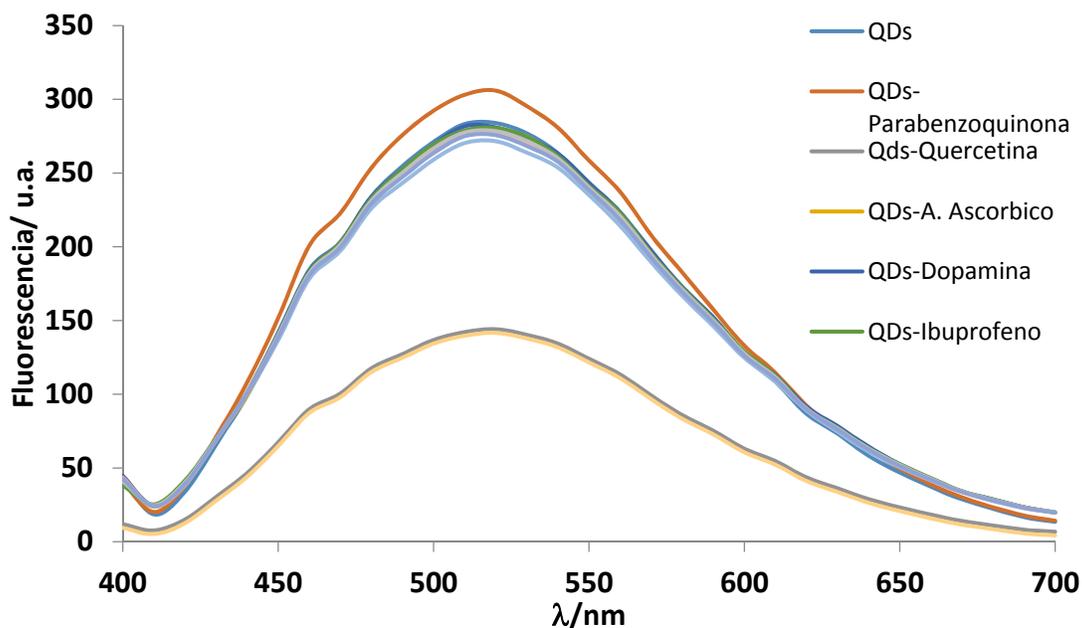


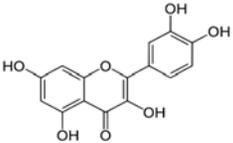
Figura 9.11. Espectros de CdS con algunos posibles interferentes a la misma concentración $5 \times 10^{-5} \text{M}$

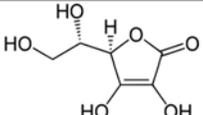
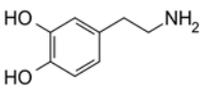
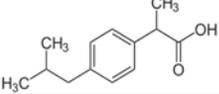
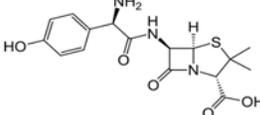
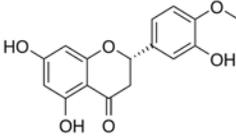
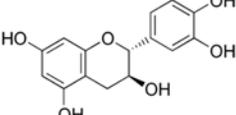
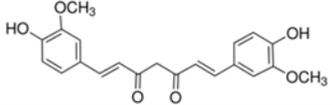
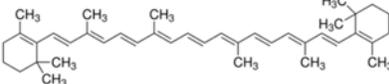
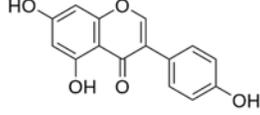
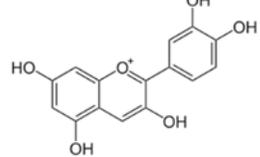
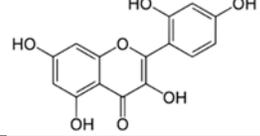
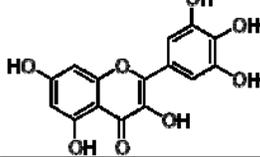
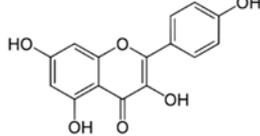
Para hacer un estudio más profundo, analizar la selectividad del método más a fondo y encontrar una explicación al porqué de la inhibición de fluorescencia, se desarrolla una nueva estrategia para explicar lo que ocurre en la Quercetina y la Curcumina, y el resto de las moléculas probadas, y solo existe algo en común que comparte la Quercetina y la Curcumina, y es que son compuestos fenólicos conjugados con dos anillos. Considerando este resultado se analizan el resto de los flavonoles objetivo de este trabajo (Miricetina, Kaempferol y Morina) y otra serie de antioxidantes y compuestos fenólicos bajo la hipótesis de que solo los compuestos fenólicos conjugados completamente con dos o más anillos son capaces de inhibir la fluorescencia.

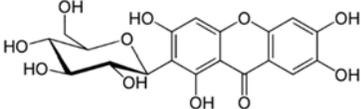
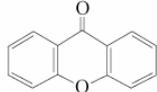
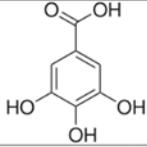
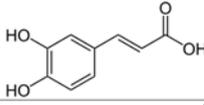
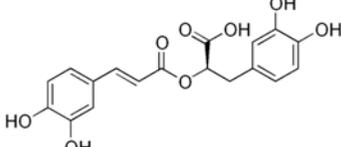
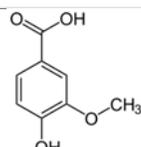
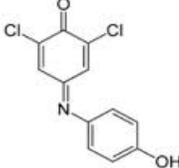
Se prueban además flavonoides que no están conjugados completamente como la catequina y la hesperetina, y un compuesto totalmente conjugado de tamaño similar pero que no presenta grupos OH como es la Xantona, de esta manera se eliminan variables para llegar a una conclusión. También otros antioxidantes conjugados pero con un solo anillo fenólico, (ya que se vio anteriormente que el catecol no inhibe la emisión) como el ácido caféico, vanílico y gálico.

La tabla 9.1 resume la estructura de las moléculas que se probaron y si inhiben o no la fluorescencia de los puntos cuánticos.

Tabla 9.1. Resumen de la inhibición de fluorescencia de los compuestos probados y estructura de las moléculas.

Compuesto	Inhibición de fluorescencia	Estructura
Parabenzocquinona	NO	
Quercetina	SI	
Catecol	NO	
Hidroquinona	NO	
Fenol	NO	

Ácido Ascórbico	NO	
Dopamina	NO	
Ibuprofeno	NO	
Amoxicilina	NO	
Hesperetina	NO	
Catequina	NO	
Curcumina	SI	
β-Caroteno	NO	
Genisteína	NO	
Cianidina	SI	
Morina	SI	
Miricetina	SI	
Kaempferol	SI	

Mangiferina	SI	
Xantona	NO	
Ácido Gálico	NO	
Ácido Caféico	NO	
Ácido rosmarinico	NO	
Ácido Vanílico	NO	
DCPI	SI pero se recupera totalmente en el tiempo y se decolora	

Se observa en la tabla que sistemas como Quercetina, Curcumina, Miricetina, Kaempferol, Morina, Cianidina y Mangiferina inhiben la fluorescencia mientras que el resto no lo hace. Hasta ahora parece que el sistema funciona conforme a la hipótesis planteada. Ya que los flavonoides como Catequina y Hesperetina que no están conjugados no inhiben la fluorescencia ni tampoco los otros compuestos conjugados más pequeños. Pero ¿qué ocurre con la Genisteína? Este cumple con los requisitos fijados al inicio, tiene total conjugación y dos anillos fenólicos. Pero si se observa bien tiene el anillo B en la posición 3 y no en la 2 como el resto de los flavonoides, de hecho es una isoflavona y carece por consiguiente del grupo OH en la posición 3, lo que hace que este compuesto no tenga las propiedades del resto. Esto hace que los resultados sean aún más favorables. Al parecer el sistema solo es selectivo a flavonoides y/o compuestos con gran actividad antioxidante totalmente conjugados con dos o más anillos fenólicos.

El caso de la DCPI donde hay una disminución temporal en la fluorescencia ayuda a elucidar el posible mecanismo de reacción y por otro lado no provoca ningún cambio en la hipótesis. Esto se discute en la sección de mecanismo de reacción más adelante.

Esta técnica puede ser una forma viable y económica de determinar este tipo de compuestos e incluso proponerla para la determinación de flavonoides totales en muestras reales de alimentos de nuestra dieta como vino, frutas, Té, etc. ¿Pero tendrá alguna relación la disminución de la fluorescencia con la actividad antioxidante de estos compuestos?

9.2.5 Relación de inhibición con la estructura

Al observar las curvas de calibración hay cambios en las pendientes lo cual indica que la fluorescencia no se inhibe de igual forma en los diferentes compuestos. De hecho la pendiente ya establece un orden de inhibición, pero para entenderlo mejor e incluir, la mangiferina, cianidina y curcumina con fines comparativos se hizo un estudio cuantitativo a la misma concentración de cada compuesto y a un valor de pH fijo de 7.4.

Para descartar errores se mide la fluorescencia intrínseca de cada sustancia por triplicado excitando a la misma longitud de onda en ausencia de CdS. La figura 9.12 muestra los resultados.

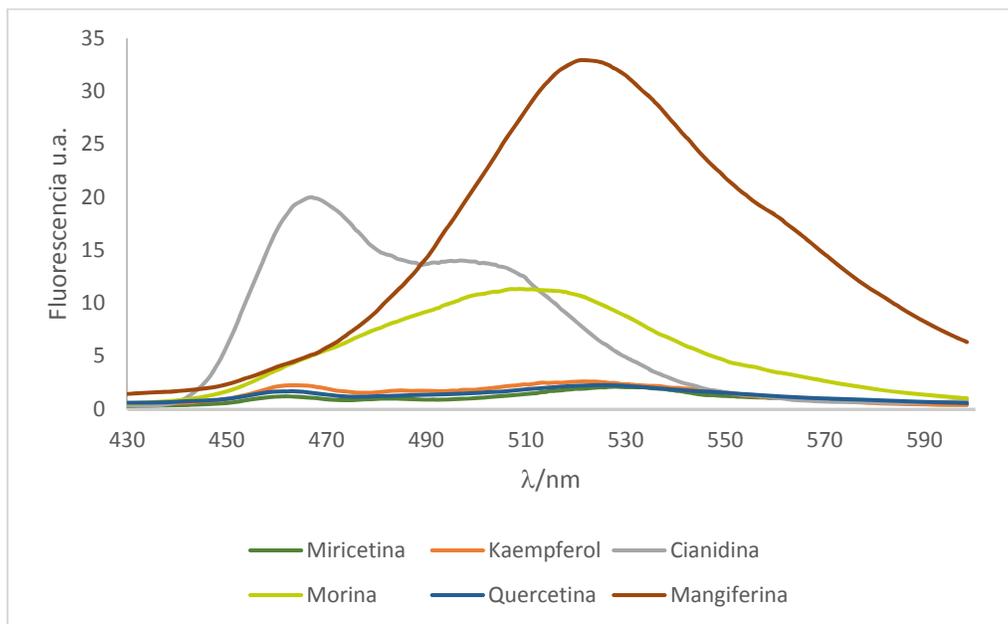


Figura 9.12. Resultados de fluorescencia de cada compuesto inhibidor a una concentración 5×10^{-5} M a un valor de pH 7.4 en ausencia de puntos cuánticos.

Se puede ver que la mangiferina es el más fluorescente de todos seguido de la cianidina y la Morina, también se observan las diferentes formas de los espectros de emisión y que coinciden con la longitud de onda de emisión de las nanopartículas. El resto no presenta fluorescencia prácticamente bajo las condiciones estudiadas.

La figura 9.13 muestra los resultados cuantitativos obtenidos. En la figura están promediados los valores del experimento realizado por triplicado y restada la fluorescencia intrínseca de cada uno de ellos. En el anexo 5 se incluye la figura A4 sin restar estos espectros, en ésta hay un cambio claro de la forma del espectro de emisión lo cual es consecuencia de la suma de la contribución de la fluorescencia intrínseca de los compuestos. Se asume que no ocurre ningún cambio en la fluorescencia intrínseca de los compuestos de interés después de realizar la mezcla Es por ello que se decide restar esta contribución.

NOTA: La tendencia es la misma para los flavonoides si no se resta la fluorescencia intrínseca.

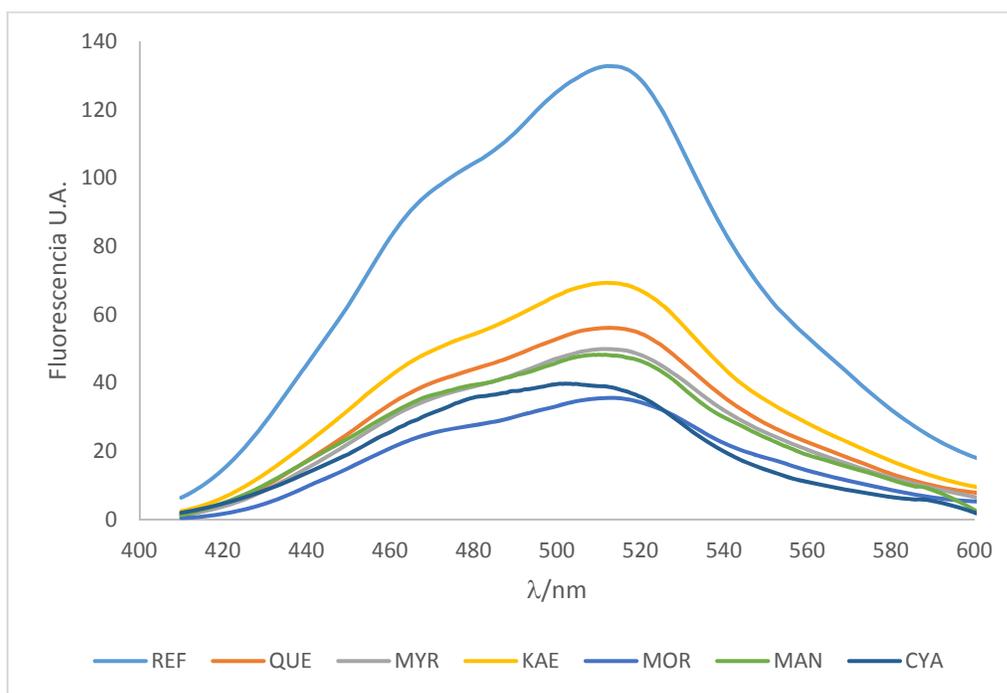


Figura 9.13. Espectros de emisión de los CdS en presencia de varios compuestos a una misma concentración ($5 \times 10^{-5} \text{M}$).

Finalmente para visualizar mejor esta tendencia en la gráfica 9.14 se puede ver el porcentaje de inhibición de fluorescencia ordenado de manera decreciente. Si relacionamos esto directamente con la actividad antioxidante, el compuesto más activo según la hipótesis sería la Morina seguida de la Cinanidina, Mangiferina, Miricetina, Quercetina, Curcumina y por último el Kaempferol.

En los compuestos de interés de este trabajo el orden de inhibición de fluorescencia y el número de OH en el anillo B sería: Morina 2 > Miricetina 3 > Quercetina 2 > Kaempferol 1. Es un orden que va de acuerdo a la cantidad de grupos fenólico en el anillo B, excepto para la Morina la cual tiene la misma cantidad de grupos OH que la Quercetina de manera general en el anillo B y uno menos que la Miricetina.

Hay que señalar que la posición del OH en el anillo B es diferente en la Morina, lo que hace que tenga el pKa más bajo y en las condiciones estudiadas es el más iónico de todos, donde contribuyen mayoritariamente el anión y el dianión. En la siguiente sección se analiza la actividad antioxidante de estos compuestos mediante el conocido método del DPPH y posteriormente se analiza la termodinámica de reacción y la cinética de forma teórica de estos compuestos frente al radical hidroperoxilo por todos los caminos de reacción posibles y se podrán comparar con los resultados obtenidos con esta técnica para ver si hay alguna relación con la actividad antioxidante.

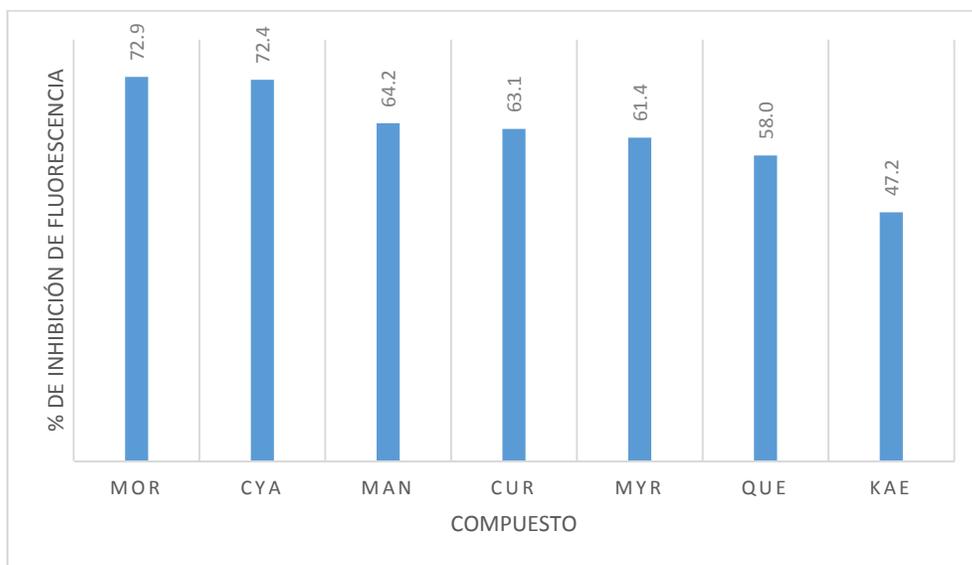


Figura 9.14. Porcentaje de inhibición relativo para cada compuesto estudiado

9.2.6 Mecanismo de reacción

Varios autores argumentan que la disminución de la fluorescencia de los CdS se debe a una transferencia electrónica de los CdS al compuesto que se conjuga con ellos, y en efecto sucede de esa manera. Pero particularmente este caso no es así ya que un antioxidante no debería quitarle electrones a los CdS y mucho menos con la tendencia que se encuentra. Por otro lado se sabe que los flavonoides forman complejos con metales y uno de ellos es el Cadmio,¹⁰⁵ por lo que se asume que la formación de este complejo con el Cd de los CdS es lo que produce que se compartan electrones en todo el sistema y se inhiba en parte la fluorescencia.

En base a esto llama la atención lo que ocurre con la DCPI, ya que se observa que inhibe la fluorescencia pero al poco tiempo se vuelve a recuperar a los valores iniciales de fluorescencia. Mientras que la DCPI pasa de color azul a transparente, de hecho la DCPI es un oxidante, en solución acuosa se encuentra en su forma oxidada y tiene un color azul a valores de pH mayores de 6. Se utiliza en la determinación de ácido ascórbico, esa reacción se sigue espectrofotométricamente, cuando la DCPI se reduce en presencia de AA pierde el color. Para analizar lo que ocurre en este caso se hace otra prueba mezclando MAA con el pH ajustado a 7.4 con DCPI y se observa que poco a poco se vuelve transparente. Con esto queda un poco más claro lo que está ocurriendo. La DCPI se conjuga con los CdS mediante un enlace peptídico y puede haber una transferencia electrónica, o la formación de un complejo con el mismo cadmio, perdiendo así la fluorescencia mientras que una reacción más lenta con el MAA en exceso en la solución de CdS provoca la reducción de la DCPI y con esto la pérdida de color. Al reducirse la DCPI se pierde el complejo con el cadmio o bien los CdS recuperan electrones, recuperando así la fluorescencia. Esto indica además, que todo este proceso de disminución de la fluorescencia de los CdS es reversible.

10 Capacidad Antioxidante con DPPH

Otra técnica que se emplea para la determinación de la actividad antioxidante es la que se basa en la reacción del radical estable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) con la especie antioxidante. Este método tiene la ventaja de obtener rápida y económicamente la información de la capacidad de la especie antioxidante al eliminar el radical (DPPH), la señal del radical se sigue espectrofotométricamente, ya que absorbe a una longitud de onda de 509 nm, y conforme disminuye la concentración del radical por efecto de la especie antioxidante la señal del radical disminuye.¹⁰⁶ Pero tiene el inconveniente de que se trata de una molécula muy grande con alto impedimento estérico por lo que el mecanismo de reacción frente a un polifenol sería mayoritariamente por transferencia electrónica.¹⁰⁷ Esto puede no simular el mecanismo frente a radicales altamente reactivos y pequeños como el hidroxilo, peroxilo, etc. que podrían reaccionar por transferencia de hidrógeno. Y son realmente los responsables de causar el estrés oxidativo.

En la actualidad, se han publicado numerosos trabajos utilizando al DPPH como indicador de la actividad antioxidante de compuestos polifenólicos, con cierto énfasis en la Quercetina por ser el más abundante en nuestra dieta,¹⁰⁸ pero a la vez es objeto de polémicas y controversias respecto al mecanismo de acción del DPPH, el efecto del solvente, diseño del experimento, entre otras.¹⁰⁹ Por ejemplo en algunos casos se utiliza el radical en exceso y en otros el polifenol en exceso mediante el seguimiento del radical a 520nm aproximadamente por espectrofotometría UV-VIS, dichos resultados no deben ser comparables, otro ejemplo es el uso de solventes, que pueden estar reportados en etanol o metanol indistintamente o mezclas de estos con agua. Y se debe prestar una especial atención a esto ya que podría haber o no especies iónicas, o mezclas de las mismas en el sistema lo que cambia totalmente el comportamiento de la reacción. Debido a lo anterior se propone obtener resultados propios utilizando esta metodología para llegar a una conclusión.

10.1 Metodología

Para los resultados definitivos que se muestran en esta sección se preparan soluciones madre de DPPH y de los compuestos a estudiar en metanol, aproximadamente 5 mg en 5 mL de cada

una de ellos. En una celda de cuarzo de longitud de paso óptico de 1 cm se agregan las correspondientes cantidades de DPPH, metanol y agua para tener una mezcla de metanol/agua 80/20 y una concentración de DPPH 1.1×10^{-4} M. Posteriormente se agregan diferentes cantidades para cada experimento del compuesto de interés y se miden los espectros de absorción en un espectrofotómetro lambda 920 marca Perkin Elmer de 210 a 680 nm de forma continua. En otro experimento se sigue la señal del DPPH en el tiempo a 519 nm (máximo de absorción del DPPH).

10.2 Resultados y discusión

El estudio con el DPPH se lleva a cabo bajo diferentes condiciones, primero se simula un pH fisiológico en una mezcla metanol:agua 80:20 con amortiguador de fosfatos a pH 7.4 y así permitir el predominio de las especies aniónicas de los flavonoides estudiados. Lamentablemente no es posible seguir espectrofotométricamente el DPPH ya que algunos de los productos de reacción absorben a la misma longitud de onda (520 nm). En el anexo 6 Figura A5 se muestran los resultados obtenidos mediante esta metodología. Se llega a esta conclusión ya que en los reactivos no hay solapamiento de bandas espectrales (anexo 7 figura A6)

Se utiliza para los experimentos definitivos una mezcla de metanol agua 80:20 que si bien no simula el pH fisiológico se acerca a un pH donde se tiene una fracción de estas moléculas desprotonada.¹⁰⁷ En el anexo 8 figuras A7, A8 y A9 también se muestran experimentos con etanol, metanol y mezclas de estos con agua, donde se aprecia que el metanol y su mezcla 80:20 es la más eficiente en la reacción de los flavonoides con el DPPH.

Se estudia la interacción del DPPH con los 4 flavonoles de interés más la Curcumina, la Mangiferina, y el Trolox como referencia. En las figuras 10.1 y 10.2 se observan los resultados obtenidos, a una concentración fija de DPPH $1.11 \mu\text{M}$ y a diferentes concentraciones de antioxidante una vez estabilizado el sistema, o a los 4 min de reacción; a la derecha los espectros de absorción de 210 a 680 nm y a la izquierda la curva de calibración correspondiente sobre el máximo de absorción en el visible a 519 nm. Los resultados de Mangiferina y Curcumina se encuentran en el Anexo 9 figuras A10 y A11

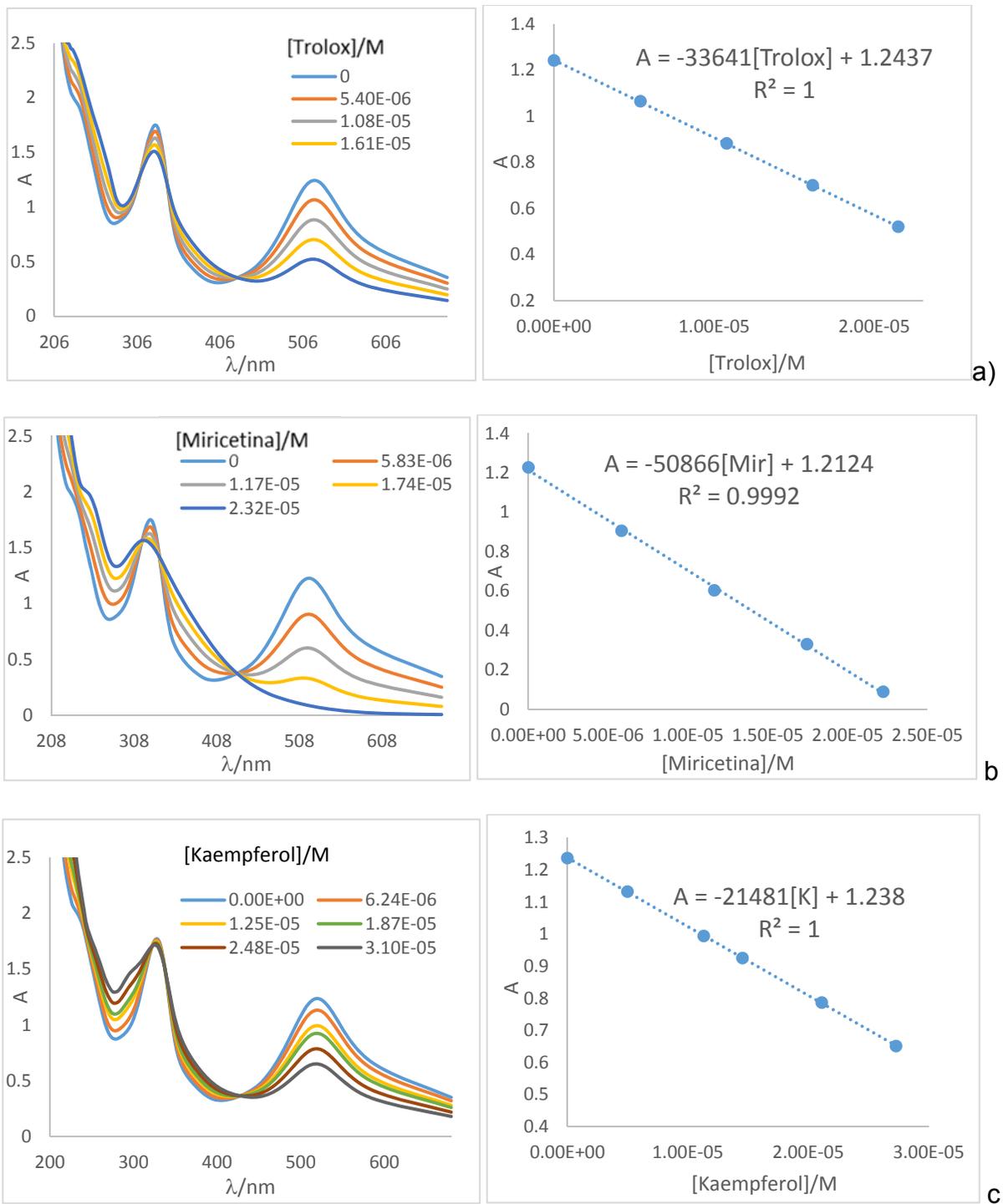


Figura 10.1. Espectros de absorción de DPPH a varias concentraciones de Trolox (a), Miricetina (b) y Kaempferol (c) más la curva de calibración correspondiente.

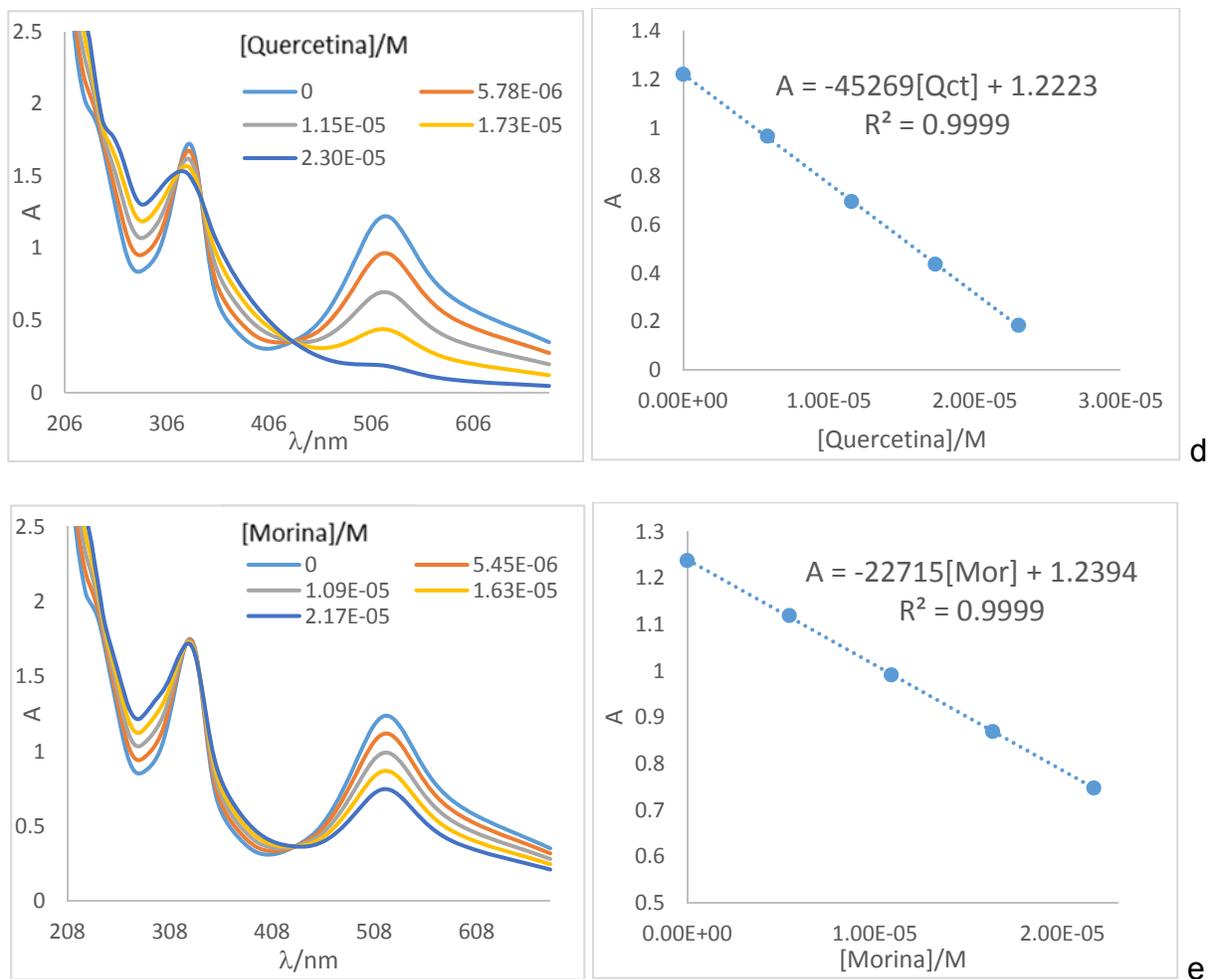


Figura 10.2. Espectros de absorción de DPPH a varias concentraciones de Quercetina (d) y Morina (e) más la curva de calibración correspondiente.

En general para cada flavonoide se observa un descenso en la absorbancia del DPPH en 519 nm lo cual es de esperarse, pero en el UV el DPPH tiene un máximo a 330 nm aproximadamente. Si se observa detenidamente las gráficas correspondientes a la Quercetina y la Miricetina hay un incremento en esta banda con un ligero desplazamiento a la derecha y permanece casi constante para Morina y Kaempferol. Es el mismo comportamiento en esta longitud de onda que en las gráficas de la sección de estabilidad. En la descomposición de la Miricetina y Quercetina a pH básico se observa esta banda que se le atribuye a la oxidación de este compuesto. Dicho de otra forma la banda correspondiente a la oxidación del grupo Catecol que no se observa en Kaempferol y Morina.

Para las curvas de calibración se observa una excelente correlación con una dependencia lineal con la concentración para cada flavonoide. Las pendientes de cada curva proporcionan la relación que existe de cada compuesto con la antioxidante. Esto se discutirá a detalle después de analizar la siguiente gráfica de Absorbancia en función del tiempo a 519 nm siguiendo el DPPH a una concentración de 5×10^{-5} M de cada compuesto (figura 10.3).

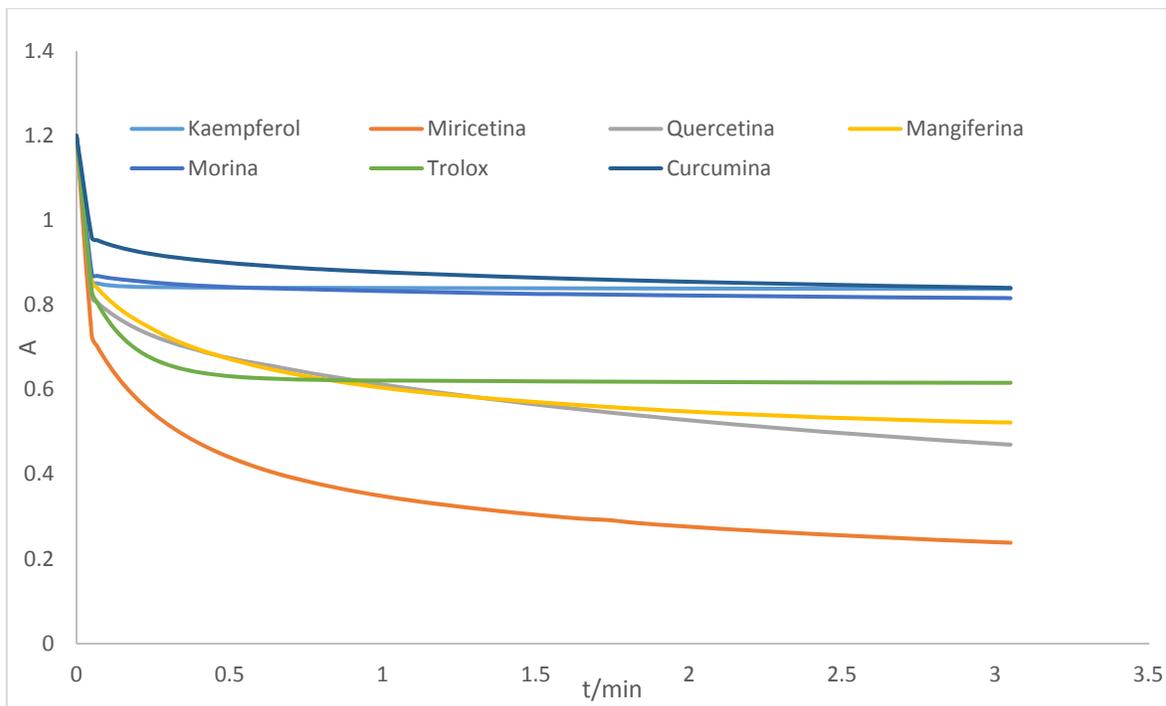


Figura 10.3. Cinética del DPPH 1.1×10^{-4} M seguida a 519 nm con los diferentes compuestos estudiados a una concentración fija de 5×10^{-5} M.

Resulta interesante examinar esta gráfica con detenimiento, considerando que todas las especies se encuentran a la misma concentración, primero como Morina y Kaempferol presentan una reacción casi instantánea con el DPPH, después de 3s que es el tiempo mínimo que se puede medir, permanece prácticamente constante hasta los 3 min. Algo que no ocurre con el resto. A los mismos 3 segundos se encuentra que la Miricetina y Quercetina disminuyen más la señal del DPPH que los dos anteriores, pero presentan una cinética adicional. Es decir, se está hablando de una primera reacción rápida, del DPPH con el flavonol por transferencia electrónica lo que tiene mucho sentido ya que esta reacción efectivamente es muy rápida. Y una segunda reacción, con una cinética mucho más lenta. Algunos autores este

comportamiento se lo atribuyen a una segunda reacción de productos oxidados para el caso de la Quercetina con otros productos del DPPH, argumentando también que hay absorción de estos productos en la misma longitud de onda que el DPPH.¹⁰⁹ Hay que tener en cuenta que este estudio lo hacen diferente, en este experimento se trabaja con un exceso de DPPH y ellos con un exceso de Quercetina. Trabajando solamente con Quercetina, quizás resulta lógico llegar a esta conclusión, pero al hacer el mismo experimento con este conjunto de sustancias es difícil de creer porque hay un comportamiento tan diferente entre Morina y Quercetina por ejemplo. Ambos tienen la misma cantidad de hidroxilos totales, la misma cantidad en el anillo B y el primer pKa de la Morina es considerablemente más bajo que el de la Quercetina. Se esperaría que la reacción de DPPH con Morina fuera más eficiente o al menos similar a la de la Quercetina, sin embargo ocurre todo lo contrario. Para analizarlo hay que mirar bien las estructuras de los compuestos, si se observa la Quercetina, Mangiferina y Miricetina, las tres que tienen una cinética diferente, comparten en su estructura una característica que el resto no presenta, el grupo catecol. La presencia de este grupo hace posible la regeneración de la molécula en el solvente en el que se está trabajando y así volver a reaccionar con el DPPH.¹¹⁰

La tabla contiene los compuestos estudiados en orden de efectividad con DPPH, el valor de la concentración del antioxidante donde el DPPH es reducido a la mitad (IC50), y con fines comparativos, características importantes como el valor del primer pKa, número de grupos OH y si presenta o no grupo catecol.

Tabla 10.1. Valor del IC50 de los diferentes compuestos estudiados a una concentración de DPPH de 1,11uM.

Compuesto	IC50/M	1er pKa	No Grupos OH	Grupo Catecol
Miricetina	1.18E-05	6.33	6	Si
Quercetina	1.35E-05	6.18	5	Si
Mangiferina	1.48E-05	6.57	4	Si
Trolox	1.85E-05	3.89	1	No
Morina	2.73E-05	4.98	5	No
Curcumina	2.76E-05	8.38	2	No
Kaempferol	2.88E-05	7.22	4	No

Se puede apreciar similitudes en los pKa de los tres primeros compuestos, todos presentan grupo catecol, pero se diferencian en el número de OH, y consecuentemente con el experimento se rige el IC50 en efectividad con el número de grupos hidroxilo, la Mangiferina no es un flavonoide pero se usa como referencia por tener el grupo catecol. Del subgrupo que no tiene el grupo catecol le sigue la Morina y por último el Kaempferol, donde esta vez coincide la hipótesis por el número de OH y por el valor de pKa. El orden global decreciente en actividad antioxidante por transferencia electrónica frente al radical DPPH quedaría de la siguiente forma:

Miricetina>Quercetina>Morina>Kaempferol

La actividad antioxidante va de acuerdo al número de grupos hidroxilo, a pesar de ser igual en Morina y Quercetina. La posición en el anillo B hace la diferencia gracias al grupo catecol que tiene la posibilidad de regenerarse en este solvente.

11 Estimación de la actividad antioxidante mediante cálculos teóricos.

Debido a la dificultad y la controversia que existe para estimar la actividad antioxidante, utilizando los métodos experimentales, considerando que las reacciones de los antioxidantes con los radicales libres pueden ocurrir por diferentes mecanismos, se aprovechan los recursos y los métodos computacionales actuales para estimar la actividad antioxidante de estos compuestos utilizando cálculos teóricos.

Los métodos computacionales más usados para determinar la actividad antioxidante consisten en evaluar índices de reactividad basados en el cálculo de energías de ionización (EI) y el cálculo de las energías de disociación de enlace (EDE).¹¹² El método de EI se utiliza para evaluar la actividad antioxidante mediante el mecanismo de transferencia electrónica, mientras que el EDE se usa para el mecanismo de transferencia de hidrógeno. Estos métodos tienen la desventaja de que solo permiten calcular los índices de reactividad por un mecanismo u otro por lo que no es posible predecir el mecanismo predominante por el cual reacciona un radical libre con un antioxidante. Además de que no se consideran las fracciones molares de las especies involucradas en el sistema a un determinado pH

Es por ello que se utiliza una metodología recientemente propuesta conocida como Quantum Mechanics-based test for Overall free Radical Scavenging Activity (QM-ORSA).¹¹³ que permite obtener datos cinéticos para reacciones químicas en solución con exactitud similar a la experimental. Donde se propone un estudio sistemático con el funcional de la densidad parametrizado M052X, el modelo continuo de solvente SMD teniendo en cuenta los posibles mecanismos de reacción, las fracciones molares de las especies a un determinado pH. El método QM-ORSA establece una correlación entre las constantes de velocidad experimentales de 16 compuestos y las teóricas con un $R^2=0.99$, una pendiente de 0.99 casi 1 y ordenada al origen 0.06 lo cual lo hace muy atractivo para estimar la actividad antioxidante de los compuestos de interés en este trabajo. Además recomiendan para este estudio el uso del radical hidroperoxilo, el cual no tiene un tiempo de vida media muy pequeño y puede ser fácilmente interceptado por compuestos fenólicos.¹¹⁴ Además de que es el más simple de los radicales peroxilo y se encuentra dentro de los de interés biológico que puede ser interceptado a tiempo para evitar el estrés oxidativo.¹¹⁵

11.1 Metodología (Cálculos termodinámicos y cinéticos)

Las optimizaciones de geometrías y los cálculos de frecuencia se llevan a cabo usando el funcional M05-2X y el conjunto de funciones de bases 6-31+G(d). Se identifican los mínimos locales y estados de transición por el número de frecuencias imaginarias 0 o 1, respectivamente.

Todos los cálculos se desarrollan con el paquete computacional Gaussian 09. Las contribuciones termodinámicas, a una temperatura de 298.15 K, se incluyen en el cálculo de energías relativas. Los efectos del solvente se modelan mediante cálculos con el modelo continuo SMD en medio acuoso.

Se incluyen los efectos de caja del solvente de acuerdo a las correcciones propuestas por Okuno,¹¹⁶ teniendo en cuenta la teoría del volumen libre propuesta por Benson.¹¹⁷

Las constantes de velocidad (k) se calculan usando la Teoría del Estado de Transición (TST)¹¹⁸⁻¹²⁰ y el estado estándar 1 M como:

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT}, \quad (11.1)$$

donde k_B y h son las constantes de Boltzman y Planck, σ es la degeneración de caminos de reacción de acuerdo al número de trayectorias de reacción equivalentes, κ la corrección de tunelaje y ΔG^\ddagger es la energía libre de activación de Gibbs. En el caso particular de las transferencias electrónicas, ΔG^\ddagger se calcula utilizando la Teoría de Marcus^{121,122,123} como:

$$\Delta G_{TES}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{TES}^0}{\lambda} \right)^2, \quad (11.2)$$

donde λ es la energía de reorganización, es decir, la energía que se requiere para “reorganizar” la estructura del sistema desde las coordenadas iniciales a las finales, sin cambiar el estado electrónico, y se define como:

$$\lambda = \Delta E_{TES(\text{vertical})} - \Delta G_{TES(\text{adiabática})}^0, \quad (11.3)$$

donde ΔE_{TES} es la diferencia de energías electrónicas verticales entre productos y reactivos, y ΔG_{TES}^0 es la energía libre de Gibbs de reacción estándar adiabática.

Las correcciones de tunelaje se calculan usando las correcciones de tunelaje de curvatura cero (ZCT).¹²⁴

Algunas de las constantes de velocidad (k) calculadas se encuentran cercanas al límite por difusión. Por lo tanto, la constante de velocidad aparente (k_{app}) no puede ser obtenida directamente de los cálculos de TST. Para incluir este efecto en el presente trabajo se utiliza la teoría de Collins-Kimball:¹²⁵

$$k_{app} = \frac{k_D k_{act}}{k_D + k_{act}}, \quad (11.4)$$

donde k_{act} es la constante de velocidad obtenida a partir de cálculos TST (ecuación 11.1), y k_D es la constante de difusión según la aproximación de Smoluchowski¹²⁶ para una reacción bimolecular irreversible controlada por difusión:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A, \quad (11.5)$$

donde R denota la distancia de reacción, es decir, en el caso de las transferencias electrónicas simples corresponde a la suma de los radios de los reactivos, N_A es el número de Avogadro, y D_{AB} es el coeficiente de difusión mutua de los reactivos A (radical) y B (antioxidante). D_{AB} se calcula a partir de la suma entre D_A y D_B de acuerdo a la referencia ¹²⁷. D_A y D_B se estiman a partir de la aproximación de Stokes–Einstein:^{128,129}

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}, \quad (11.6)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η denota la viscosidad del disolvente, en este caso agua ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s), y a es el radio del soluto que se obtiene para cada especie a partir de su volumen calculado.

11.2 Resultados y Discusión

11.2.1 Cálculos Termodinámicos

Se realiza el estudio termodinámico de la reacción de Quercetina con el radical hidroperoxilo por todos los caminos de reacción posibles. Los cuales son; adición, transferencia de hidrógeno, y transferencia electrónica para todas las especies involucradas en el sistema. A un pH de 7.4 de acuerdo a los pKas de la Quercetina y el diagrama de distribución se tienen 3 especies, la neutra, monoaniónica y dianiónica con fracciones molares de 0.03, 0.51 y 0.46 respectivamente. A continuación en la tabla 11.1 se muestran estos resultados.

Esquemas de reacción:

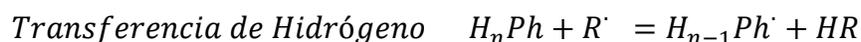
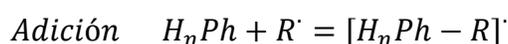


Tabla 11.1 Energías ΔG de reacción de los 3 mecanismos estudiados de las diferentes especies de la Quercetina con el radical hidroperoxilo.

Posición	Neutro	Monoanión	Dianión
	ΔG (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
Adición			
a5	16.78	16.83	18.82
a6	20.89	20.78	16.25
a7	22.47	19.29	25.43
a8	19.51	19.35	15.52
b1	26.06	22.56	-----
b2	16.80	15.78	17.43
b3	16.23	11.57	11.10
b4	11.38	14.53	14.17
b5	19.46	16.00	15.62
b6	14.20	14.64	14.52
c1	3.56	5.18	3.30
c2	8.29	7.65	5.46
c3	22.41	7.69	12.70
c4	-----	-----	-----
c9	24.83	24.32	-----
Abstracción			
5a	7.85	-1.11	2.76

7a	7.96	-5.02	-----	
3a'	-2.21	-9.13		-9.97
4a'	-3.75	-----	-----	
3a	-3.77	-11.91		-12.86
Transferencia				
	28.65	6.83		4.44

Como se aprecia en la tabla, no hay ninguna reacción exergónica para el mecanismo de adición en ninguna de las especies. Para el mecanismo de transferencia de hidrógeno hay 3 posiciones termodinámicamente viables para la especie neutra, 4 para el anión y 2 para el dianión. Las energías por transferencia electrónica podrían ser relevantes para el anión y en dianión a pesar de ser endergónicas.

También se hicieron los cálculos termodinámicos para la Morina (tabla 11.2), pero esta vez se omiten todas las reacciones correspondientes al mecanismo de adición ya que se vio que un sistema similar como la Quercetina no tenía ningún producto viable termodinámicamente. Además está demostrado en varios trabajos previos que los compuestos polifenólicos no reaccionan por adición.⁷⁶ Para la Morina a pH 7.4 predomina el Monoanión y el Dianión con fracciones molares de 0.68 y 0.32 respectivamente.

Tabla 11.2. Valores de ΔG de reacción de las diferentes especies de la Morina con el radical hidroperoxilo. Por el mecanismo de Transferencia de H y Transferencia electrónica.

Posición	Monoanión	Dianión
Abstracción H	DG (kcal/mol)	DG (kcal/mol)
3a	4.10	1.24
4a'	-4.21	-6.69
5a	3.35	4.64
7a	-1.67	
Transferencia E	11.13	6.71

Además se incluyen los cálculos de transferencia electrónica de la Miricetina y Kaempferol (tabla 11.3) donde predominan a pH fisiológico la especie neutra, el monoanión, el dianión para el Kaempferol con fracciones molares de 0.39, 0.59 y 0.03 respectivamente y el monoanión y el dianión para la Miricetina con fracciones molares de 0.53 y 0.45 respectivamente.

Tabla 11.3 Valores de ΔG de reacción de las diferentes especies de la Miricetina y el Kaempferol con el radical peroxilo por el mecanismo de Transferencia electrónica.

Mecanismo de transferencia E	
Kaempferol	ΔG (kcal/mol)
Neutro	29.72
Monoanión	18.20
Dianión	4.91
Miricetina	
	ΔG (kcal/mol)
Monoanión	4.24
Dianión	2.04

11.2.2 Cálculos Cinéticos

Para la Quercetina se encontraron dos estados de transición (ET) que corresponden al anión, son los dos más energéticos según la termodinámica por las posiciones 3a' y 3a. En la figura 11.1 se muestran los ET.

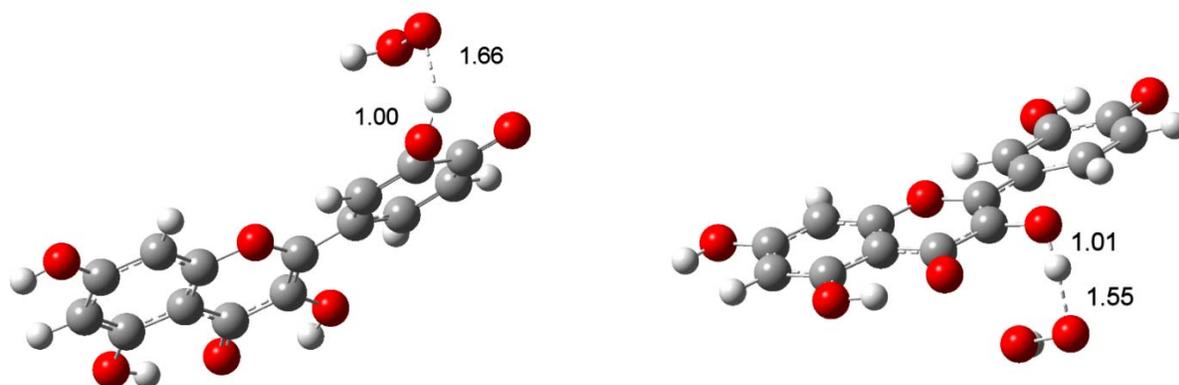


Figura 11.1. Geometría optimizada de los estados de transición de la Quercetina del Monoanión.

No es posible calcular los ET del dianión porque no existen, es decir no tienen barrera por lo que para el dianión la constante de velocidad se establece por el límite de difusión.

Para la Morina ocurre lo mismo que con el dianión de la Quercetina, se demuestra que no existe barrera o ET haciendo un barrido de la energía potencial variando la distancia del Hidrógeno de la posición 4a' de la Morina desde los reactivos y acercándolo al radical sobre la coordenada de reacción hasta los productos observando así como en todo momento la energía baja. Ver Figura 11.2.

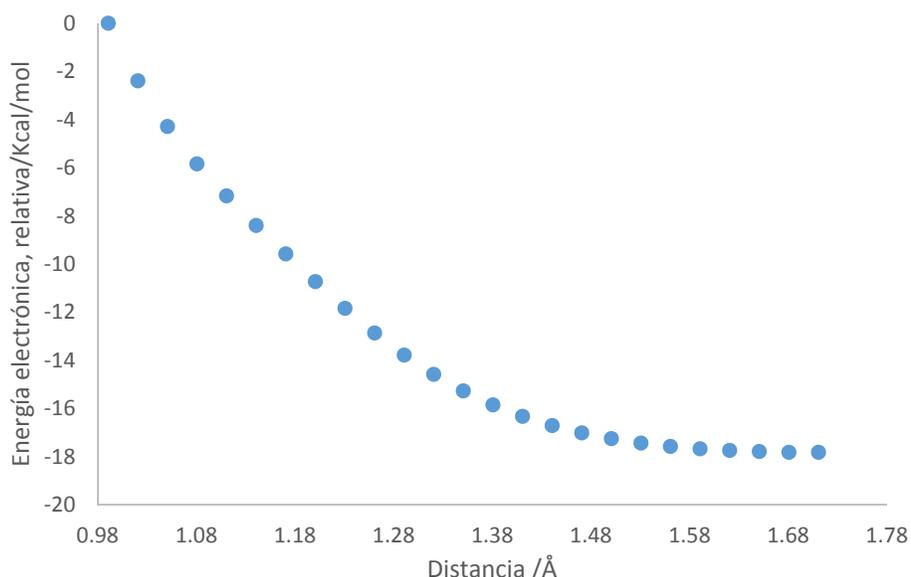


Figura 11.2. Energía Electrónica relativa del sistema en función de la distancia del H sobre la coordenada de reacción.

A continuación en la Tabla 11.4 se resumen las constantes de velocidad calculadas para la Quercetina y Morina por los mecanismos de transferencia de H y transferencia electrónica además de las de la Miricetina y Kaempferol por este último mecanismo.

Tabla 11.4. Constantes de velocidad de reacción para cada especie de los compuestos de interés por los mecanismos estudiados.

Neutra	Monoanión	Dianión	Global
k Transferencia de Hidrógeno ($M^{-1}s^{-1}$)			

Quercetina	1.36E+03	3.13E+08	1.26E+09	1.57E+09
Morina		1.85E+09	8.65E+08	2.72E+09
k Transferencia Electrónica (M ⁻¹ s ⁻¹)				
Quercetina		5.13E+06	7.12E+07	7.63E+07
Morina		2.07E+04	2.85E+05	3.05E+05
Kaempferol	1.82E-11	1.02E-01	2.18E+06	2.18E+06
Miricetina		9.49E+07	4.90E+08	5.85E+08

Se observa en la tabla una tendencia general en todos los compuestos, a medida que se desprotonan aumenta considerablemente la constante de velocidad. Esto se debe a que aumenta el carácter electrodonador de los átomos de oxígeno que perdieron el protón. Y en general la molécula puede donar más fácil un electrón o transferir un átomo de hidrógeno. También se puede apreciar que la constante de velocidad global por transferencia de H de la Morina es casi el doble de la de la Quercetina y muy rápidas ambas del orden de 10⁹ muy cercanas al límite por difusión. Ambos compuestos con la misma cantidad de grupos OH en el anillo B pero con un cambio en la posición de 3' en la Quercetina a 2' en la Morina hace que esta última sea más reactiva mediante este mecanismo. Esto podría atribuirse a que en la Quercetina a diferencia de la Morina (aniónica o dianiónica) se forma un puente de hidrógeno entre el oxígeno en la posición 4' y el hidrógeno enlazado al oxígeno de la posición 3' fortaleciendo la salida del H en esa posición.

En el mecanismo de transferencia electrónica se encuentra que la más rápida es la Miricetina, seguida de la Quercetina, el Kaempferol y la Morina. Se establece un orden para los 3 primeros de acuerdo al número de grupos OH en el anillo B. La Morina de alguna forma con el cambio de posición no está favorecida por la transferencia electrónica.

Cabe aclarar que el mecanismo de transferencia electrónica no es el que rige esta reacción. El radical hidroperoxilo nunca reaccionaría con estos compuestos por este mecanismo como se aprecia en la tabla por lo que el orden que se establece es solo con fines comparativos.

Uno de los aspectos importantes de seguir esta metodología es tener en cuenta las fracciones molares de cada especie lo que se evidencia en todos los casos. Por ejemplo en el Kaempferol donde mayoritariamente se encuentran las especies neutra y monoaniónica, no aportan nada a la constante de velocidad, la especie dianiónica con solo el 3% de abundancia relativa decide

completamente la velocidad de reacción. Esto también demuestra la importancia de conocer de forma precisa las constantes de acidez.

12 Comparación de los métodos para la actividad antioxidante

Los resultados obtenidos mediante los tres métodos se resumen en orden de actividad antioxidante en la tabla 12.1

Tabla 12.1 Orden de actividad antioxidante de los métodos empleados para los 4 compuestos estudiados.

	DPPH	Puntos Cuánticos	Computacional	
			Transferencia E	Transferencia de H
1	Miricetina	Morina	Miricetina	Morina
2	Quercetina	Miricetina	Quercetina	Quercetina
3	Morina	Quercetina	Kaempferol	-----
4	Kaempferol	Kaempferol	Morina	-----

El orden obtenido con el método del DPPH coincide con el obtenido mediante el mecanismo de transferencia electrónica estudiado en esta sección excepto por la Morina, no se pueden esperar resultados idénticos ya que se emplean radicales muy diferentes. No obstante las constantes de velocidad para Morina y Kaempferol son muy parecidas entre ellas al igual que el IC50 obtenido con el DPPH.

Respecto a los CdS si se relaciona el porcentaje de inhibición con la actividad antioxidante, coincide con el resultado obtenido hasta el momento mediante el mecanismo de abstracción de H, que ubica a la Morina como la más reactiva. Se necesita completar el trabajo haciendo el estudio teórico completo con la Miricetina y el Kaempferol, no obstante ya que la Morina no presenta barrera, la Miricetina no podría ser más reactiva porque el límite está establecido por difusión. Es de esperar también que la Miricetina sea más reactiva que la Quercetina ya que tiene los grupos hidroxilo en la misma posición que la Quercetina, más uno extra en la posición 5'. El Kaempferol de acuerdo a todos los criterios permanecería en último lugar. Considerando esta información los CdS estarían funcionando como indicadores de actividad antioxidante de flavonoles gracias además a su gran selectividad.

13 Conclusiones

Se determinaron las constantes de acidez de forma espectrofotométrica usando UV-VIS y el programa computacional SQUAD de los compuestos de interés. Se encontró que la Quercetina y la Miricetina son inestables a pHs altos y se propone un método para corregir los espectros de absorción de la cinética de descomposición de estos compuestos y así obtener valores de pKa confiables a pH básico.

Se propone que un intermediario radicalico es el causante de la alta inestabilidad de la Miricetina a pH básico, al cual se asocia una banda en los 600nm aproximadamente, que no presenta el resto de los compuestos.

Se obtuvo el orden de desprotonación de los 4 flavonoles siguiendo el criterio de afinidades protónicas, con métodos de la Química Computacional, lo que completa la información acerca de los equilibrios de acidez de los compuestos estudiados y permite identificar de manera inequívoca las especies predominantes a cada pH.

Para la Miricetina no es posible medir experimentalmente los 3 pKas más altos. Por este motivo se estimaron estos valores a partir de una correlación entre los pKa experimentales y los ΔG calculados, utilizando todos los datos disponibles para todos los compuestos estudiados. Esto permitió proponer por primera vez el conjunto completo de pKas para la Miricetina.

Se realizaron varias síntesis de puntos cuánticos en solución acuosa, variando diferentes parámetros (pH, concentraciones, temperatura) y se analizó el efecto de estos cambios en el rendimiento. Con esta información fue posible proponer una técnica óptima para lograr puntos cuánticos de alta fluorescencia. Al caracterizarlos con TEM, se observaron nanopartículas de varios tamaños y en ocasiones agregados esféricos.

Estas nanopartículas de CdS se utilizaron para determinaciones cuantitativas de los compuestos de interés en este trabajo, por inhibición de fluorescencia. Además se propone que existe una correlación entre este fenómeno y la capacidad antioxidante de los flavonoles estudiados. Se espera que este método muestre selectividad a compuestos fenólicos de dos o más anillos conjugados.

Se aplicó el método de DPPH para cuantificar la capacidad antioxidante. Se encontró una eficiencia máxima con mezclas metanol/agua 80/20. Se observó una relación directa entre el

número de grupos fenólicos en el anillo B y la facilidad de inhibir la señal del DPPH, o lo que es lo mismo la eficiencia de la reacción por transferencia electrónica con este radical. También se evidenció la regeneración del grupo catecol en este solvente, lo que aumenta la eficiencia antioxidante por de compuestos como la Miricetina y Quercetina frente al DPPH.

El estudio teórico de la actividad antioxidante, frente al radical hidroperoxilo, también permitió establecer un orden en la reactividad. A diferencia del ensayo con DPPH, en este caso se pudo identificar la dependencia de la capacidad antioxidante con el mecanismo de reacción. Para este tipo de estudios es de alta importancia considerar los diferentes mecanismos posibles y la distribución de especies a un pH determinado, para lo cual es imprescindible conocer de manera confiable los pKas de los compuestos de interés.

Para los compuestos estudiados se propone la siguiente tendencia en cuanto a capacidad antioxidante: Morina>Miricetina>Quercetina>Kaempferol (por transferencia de H). y Miricetina>Quercetina>Kaempferol>Morina (por transferencia electrónica). En general a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo en el anillo B, aumenta la actividad antioxidante si estos se encuentran en posiciones vecinas. En los aniones de la Morina al no tener puente de hidrógeno en el anillo se favorece la transferencia de H al radical haciendo que sea la más activa de todas por transferencia de hidrógeno, lo que demuestra la importancia de la posición de los grupos hidroxilo.

14 Perspectivas

- 1- Hacer un estudio de CdS con muestras reales, como vino, Te, frutas, etc, para determinar flavonoides totales y comparar con valores en la literatura para comprobar la eficiencia del método.
- 2- Utilizar un método electroquímico, específicamente cronoamperometría de DPPH con Quercetina y Morina, para poder medir desde tiempo cero siguiendo la señal de DPPH, además de eliminar la absorciones inespecíficas que ocurren por traslape de bandas en el método espectrofotométrico. Comparar resultados.
- 3- Realizar el estudio termodinámico y cinético para Kaempferol y Miricetina utilizando la misma metodología con los cálculos computacionales para completar los 4 flavonoles.

15 Referencias

-
- ¹Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, *61*, 1-31.
- ²Pham-HuyLA, HeH, Pham-HuyC. Free radicals, antioxi-dants in disease and health. *Int J Biomed Sci* **2008**;4 :89–96.
- ³Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and per-oxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; *87*:315–424.
- ⁴Blake, D., Winyard, P.G. *Immunopharmacology of Free Radical Species*; Academic Press: San Diego, **1995**.
- ⁵Harman, D.J. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry, *Gerontology* **1956**, *11*, 289-300.
- ⁶Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., In *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.
- ⁷Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R.C., Locke, S.J., *Biochem. Biophys. Acta* **1987**, *924*, 408-419
- ⁸Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. **1994**, *344*, 721-724
- ⁹Warma, S.D., Devamanoharan, P.S. Morris, S.M. Prevention of cataracts by nutritional and metabolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, *35*, 111-129.
- ¹⁰Sies, H. *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy, Advances in Pharmacology*, Vol. 38; Academic Press: San Diego, **1997**
- ¹¹Perron, N. R.; Brumaghim, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell. Biochem. Biophys.* **2009**, *53*, 75–100.
- ¹²Aherne S. A.; O'Brien N. M.; Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 75–81.
- ¹³Pace-Asciak, C. R.; Hahn, S.; Diamandis, E. P.; Soleas, G.; Goldberg, D. M. The Red Wine Phenolics trans-Resveratrol and Quercetin Block Human Platelet Aggregation and Eicosanoid Synthesis: Implications for Protection Against Coronary Heart Disease. *Clin. Chim. Acta* **1995**, *235*, 207–219.
- ¹⁴Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* **1997**, *275*, 218–221.
- ¹⁵Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease, *Lancet* **1992**, *339*, 1523–1526.

-
- ¹⁶ Morton, L. W.; Caccetta, R. A. A.; Puddey, I. B.; Croft, K. D. Chemistry and Biological Effects of Dietary Phenolic Compounds: Relevance to Cardiovascular Disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2000**, *27*, 152–159.
- ¹⁷ Corder, R.; Mullen, W.; Khan, N. Q.; Marks, S. C.; Wood, E. G.; Carrier, M. J.; Crozier, A. Oenology: Red Wine Procyanidins and Vascular Health. *Nature* **2006**, *444*, 566.
- ¹⁸ Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 77–84.
- ¹⁹ Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T. Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1460–1464.
- ²⁰ Jiang, F.; Dusting, G. J. Natural Phenolic Compounds as Cardiovascular Therapeutics: Potential Role of Their Antiinflammatory Effects. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2003**, *1*, 135–156.
- ²¹ Sokmen, M.; Serkedjieva, J.; Daferera, D.; Gulluce, M.; Polissiou, M.; Tepe, B.; Akpulat, H. A.; Sahin, F.; Sokmen, A. In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum Acutidens*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3309–3312.
- ²² Stavric, B. Antimutagens and Anticarcinogens in Foods, *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 79–90.
- ²³ Brown, D. M.; Kelly, G. E.; Husband, A. J. Flavonoid Compounds in Maintenance of Prostate Health and Prevention and Treatment of Cancer. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 253–270.
- ²⁴ Ramassamy, C. Emerging Role of Polyphenolic Compounds in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Review of Their Intracellular Targets. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *545*, 51–64.
- ²⁵ Hamaguchi, T.; Ono, K.; Murase, A.; Yamada, M. Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology Through Different Effects on the Amyloid- β Aggregation Pathway. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2557–2565.
- ²⁶ Hsu, S. Green Tea and the Skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2005**, *52*, 1049–1059.
- ²⁷ Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I.; Dietary Phytoestrogens and Health. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995–1016.
- ²⁸ Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids, *Free Rad. Res.* **1995**, *22*, 375–383.
- ²⁹ Cook, N. C.; Samman, S. Flavonoids - Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76.
- ³⁰ Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *G. Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.
- ³¹ Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749–760.
- ³² Kahkonen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954–3962.

-
- ³³ Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A. E. M.; Rietens, I. M. C. M. The Influence of pH on Antioxidant Properties and the Mechanism of Antioxidant Action of Hydroxyflavones. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 869–881.
- ³⁴ Materska, M.; Perucka, I. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum Annuum* L.) *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1750–1756.
- ³⁵ Fernandez-Panchon, M. S.; Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From in Vitro Results to in Vivo Evidence. *Crit. Rev. Food Sci.* **2008**, *48*, 649–671.
- ³⁶ Havsteen B. Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 1141–1148.
- ³⁷ Peres W. Radicais Livres em Níveis Biológicos. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, **1994**, pp. 49–81.
- ³⁸ Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochem Pharmacol* **1983**, *32*, 1141-1148.
- ³⁹ Peres W., *Radicais Livres em níveis biológicos*. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, **1994**, 49-81.
- ⁴⁰ Larson, R. A. The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 969-978.
- ⁴¹ Gorinstein, S., Barnitkowska, E., Kulasek, G., Zemser, M., Trachtenberg, S. Dietary persimmon improves lipid metabolism in rats fed diets containing cholesterol., *J. Nutr.* **1998**, *128*, 2023-2027.
- ⁴² Kühnau, J. The Flavonoids : a class of semi-essential food components, *World Rev Nutr Diet* **1976**, *24*, 117-190.
- ⁴³ Bors, W., Heller W., Christa, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical- scavenging efficiencies, *Methods Enzymol* **1990**, *186*, 343-355.
- ⁴⁴ Letan, A. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives, *J Food Sci* **1966**, *31*, 518-523.
- ⁴⁵ Wang, W., Goodman, M. T. Antioxidant properties of dietary phenolic agents in a ... model: interaction of protein binding activity, *Nutr. Res.* **1999**, *19*, 191-202.
- ⁴⁶ Wang, C.C. ChingY.C., Michael S.R., Brain antioxidant capacity in rat models of betacytotoxic-induced experimental sporadic Alzheimer's disease and diabetes mellitus , *Clinical Chemistry* **2004**, *50*, 952-954.

-
- ⁴⁷ M. Manuela Silva, Marta R. Santos, Gonc, Alo Caroc,O, Rui Rocha, Gonc, Alo Justino And Lurdes Mira, Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination *Free Radical Research* **2002**, 36, 1219–1227.
- ⁴⁸ Kelly L. Wolfe, Rui Hai Liu, Structure–Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8404–8411
- ⁴⁹ Chen, P. T., Chan, K. Y., Ho, K. P., Wang, J., Antioxidant Activity Groups, *Chemistry And Physics Of Lipids* **1996**, 79, 157-163.
- ⁵⁰ Pérez-González, A.; Galano, A. OH Radical Scavenging Activity of Edaravone: Mechanism and Kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 1306–1314.
- ⁵¹ Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M. Physicochemical Insights on the Free Radical Scavenging Activity of Sesamol: Importance of the Acid/Base Equilibrium. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, 115, 13101–13109.
- ⁵² León-Carmona, J. R.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Galano, A. On the Peroxyl Scavenging Activity of Hydroxycinnamic Acid Derivatives. Mechanisms, Kinetics, and Importance of the Acid/Base Equilibria. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 12534–12543.
- ⁵³ Newton, D. W.; Kluza, R. B. pKa Values of Medicinal Compounds in Pharmacy Practice. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **1978**, 12, 546–554.
- ⁵⁴ Robert S. D. Understanding Polyelectrolytes. *Modern drug discovery, Am. Chem. Soc.* **2004**, 41–44.
- ⁵⁵ Albert, A.; Serjeant, E. P. Potentiometry and Potentiometric Titrations, John Wiley and Sons, New York, **1984**.
- ⁵⁶ Albert, A.; Serjeant, E. P. The Determination of Ionization Constant, Chapman and Hall, London, **1971**.
- ⁵⁷ Ramírez-Silva, M. T.; Gómez-Hernández, M.; Pacheco-Hernández, M. de L.; Rojas-Hernández, A.; Galicia, L. Spectroscopy Study of 5-Amino-1,10-Phenanthroline. *Spectrochim. Acta Part A* **2004**, 60, 781–789.
- ⁵⁸ Ishihama, Y.; Oda, Y.; Asakawa, N. Microscale Determination of Dissociation Constants of Multivalent Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 1500–1507.
- ⁵⁹ Rodríguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernández, A.; Gutiérrez, A.; Moya-Hernández, R.; Gómez-Balderas, R.; Ramírez-Silva, M. T. Determination of pKa Values of Tenoxicam from ¹H NMR Chemical Shifts and of Oxicams from Electrophoretic Mobilities (CZE) with the Aid of Programs SQUAD and HYPNMR. *Talanta* **2009**, 80, 754–762.
- ⁶⁰ Sánchez-Rivera, A. E.; Corona-Avenidaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Rojas-Hernández, A.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M. A. Spectrophotometric Study on the Stability of Dopamine and the Determination of its Acidity Constants. *Spectrochim. Acta A* **2003**, 59, 3193–3203.
- ⁶¹ Legget, D. J.; McBryde, W. A. E. General Computer Program for the Computation of Stability Constants from Absorbance Data. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1065–1070.

-
- ⁶² Legget, D. J. *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, **1985**.
- ⁶³ Wang, L.; Tu, Y.-C.; Lian, T.-W.; Hung, J.-T.; Yen, J.-H.; Wu, M.-J. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9798–9804.
- ⁶⁴ Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.-L. A DFT Study of the Reactivity of OH Groups in Quercetin and Taxifolin Antioxidants: The Specificity of the 3-OH Site. *Food Chem.* **2006**, *97*, 679–688.
- ⁶⁵ Ghidouche, S.; Es-Safi, N. E.; Ducrot, P. H. Trtmetes Versicolor Laccase Mediated Oxidation of Flavonoids. Influence of the Hydroxylation Pattern of Ring B of Flavonols. *Am. J. Food Technol.* **2007**, *2*, 630–640.
- ⁶⁶ Qin, C. X.; Chen, X.; Hughes, R. A.; Williams, S. J.; Woodman, O. L. Understanding the Cardioprotective Effects of Flavonols: Discovery of Relaxant Flavonols without Antioxidant Activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1874–1884.
- ⁶⁷ Xiao, J.; Suzuki, M.; Jiang, X.; Chen, X.; Yamamoto, K.; Ren, F.; Xu, M. Influence of B-Ring Hydroxylation on Interactions of Flavonols with Bovine Serum Albumin, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2350–2356
- ⁶⁸ Wolfe, K. L.; Liu, R. H. Structure–Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8404–8411
- ⁶⁹ Cao, S.; Jiang, X.; Chen, J. Effect of Zinc (II) on the Interactions of Bovine Serum Albumin with Flavonols Bearing Different Number of Hydroxyl Substituent on B-ring. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 146–152.
- ⁷⁰ Yi, L.; Jin, X.; Chen, C.-Y.; Fu, Y.-J.; Zhang, T.; Chang, H.; Zhou, Y.; Zhu, J.-D.; Zhang, Q.-Y.; Mi, M.-T. Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5471–5489.
- ⁷¹ Tyukavkina, N. A.; Pogodaeva, N. N. Ultraviolet Absorption of Flavonoids VIII. Ionization Constants of Kaempferol and Quercetin. *Chem. Nat. Compd.* **1975**, *11*, 741–743.
- ⁷² Herrero Martinez, J. M.; Sanmartin, M.; Roses, M.; Bosch, E.; Rafols, C. Determination of Dissociation Constants of Flavonoids by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *28*, 1886–1895.
- ⁷³ Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tomic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846–4851.
- ⁷⁴ Herrero-Martínez, J. M.; Repollés, C.; Bosch, E.; Rosés, M.; Ràfols, C. Potentiometric Determination of Aqueous Dissociation Constants of Flavonols Sparingly Soluble in Water. *Talanta* **2008**, *74*, 1008–1013
- ⁷⁵ Zenkevich, I. G.; Guschina, S. V. Determination of Dissociation Constants of Species Oxidizable in Aqueous Solution by Air Oxygen on an Example of Quercetin, *J. Anal. Chem.* **2010**, *65*, 371–375.
- ⁷⁶ Pérez-González, A.; Rebollar-Zepeda, A. M.; León-Carmona, J. R.; Galano, A. Reactivity Indexes and O-H Bond Dissociation Energies of a Large Series of Polyphenols: Implications for their Free Radical Scavenging Activity. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 241–249.

- ⁷⁷ Xu, G.-R.; In, M. Y.; Yuan, Y.; Lee, J.-J.; Kim, S. In situ Spectroelectrochemical Study of Quercetin Oxidation and Complexation with Metal Ions in Acidic Solutions. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 889–892.
- ⁷⁸ Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- ⁷⁹ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; 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.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009., Gaussian 09, Revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, **2009**.
- ⁸⁰ Liptak M. D.; Shields G. C. Accurate pKa Calculations for Carboxylic Acids Using Complete Basis Set and Gaussian-n Models Combined with CPCM Continuum Solvation Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7314–7319.
- ⁸¹ Liptak M. D.; Gross K. C.; Seybold P. G.; Feldgus S.; Shields G. C. Absolute pKa Determinations for Substituted Phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421–6427.
- ⁸² Palascak, M. W.; Shields, G. C. Accurate Experimental Values for the Free Energies of Hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3692–3694.
- ⁸³ Murłowska, K.; Sadlej-Sosnowska, N. Absolute Calculations of Acidity of C-Substituted Tetrazoles in Solution. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5590–5595.
- ⁸⁴ Brown T. N.; Mora-Diez N. Computational Determination of Aqueous pKa Values of Protonated Benzimidazoles (Part 1). *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9270–9279.
- ⁸⁵ Rebollar-Zepeda, A. M.; Campos-Hernández, T.; Ramírez-Silva, M. T.; Rojas-Hernández, A.; Galano, A. Searching for Computational Strategies to Accurately Predict pKas of Large Phenolic Derivatives. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2528–2538.
- ⁸⁶ Rebollar-Zepeda, A. M.; Galano, A. First Principles Calculations of pKa Values of Amines in Aqueous Solution: Application to Neurotransmitters. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 3449–3460.
- ⁸⁷ Camaioni, D. M.; Schwerdtfeger, C. A. Comment on "Accurate Experimental Values for the Free Energies of Hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺". *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 10795–10797.
- ⁸⁸ Ho, J.; Coote, M. L. A Universal Approach for Continuum Solvent pKa Calculations: Are We There Yet? *Theor. Chem. Acc.* **2009**, *125*, 3–21.
- ⁸⁹ Ho, J.; Coote, M. L., PKa Calculation of Some Biologically Important Carbon Acids - An Assessment of Contemporary Theoretical Procedures. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 295–306.

-
- ⁹⁰ Gao X, Yang L, Petros JA, Marshall FF, Simons JW, Nie S In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr Opin Biotechnol* 16:63–72
- ⁹¹ Costa JM, Rosario Pereiro R, Sanz-Medel A., The use of luminescent quantum dots for optical sensing. *Trend Anal Chem*, **2006** 25:207–218
- ⁹² Liu T, Liu B, Zhang H, Wang Y., The fluorescence bioassay platforms on quantum dots nanoparticles. *J Fluoresc*, **2006**, 15:729–733
- ⁹³ Biju V, Itoh T, Anas A, Sujith A, Ishikawa M., Semiconductor quantum dots and metal nanoparticle, syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal Bioanal Chem*, **2008**, 391:2469–2495.
- ⁹⁴ Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Iyer G, Weiss S., Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials*, **2006**, 27:1679–1687
- ⁹⁵ Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, Pocock R, Imani M, Seifalian AM., Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, **2007**, 28:4717–4732
- ⁹⁶ Wu XY, Wu X, Liu H, Liu J, Kari N, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, Nianfeng GN, Peale F, Bruchez MP, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, **2003** 21:41–46
- ⁹⁷ Hild WA, Breuning M, Goepferich A., Quantum dots-Nanosized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *Eur J Pharm Biopharm*, **2008** 68:153–168
- ⁹⁸ Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A., In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, **2002**, 298:1759–1762
- ⁹⁹ Taylor JR, Fang MM, Nie SM., Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Anal Chem*, **2000**, 72:1979–1986
- ¹⁰⁰ Zou L, Fang Z, Gu Z, Zhong X, Aqueous phase synthesis of biostabilizer capped CdS nanocrystals with bright emission. *J Lumin*, **2009**, 129:536–540
- ¹⁰¹ Unni C, Philip D, Gopchandran KG, Studies on optical absorption and photoluminescence of thioglycerol-stabilized CdS quantum dots. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. **2008**
- ¹⁰² Unni C, Philip D, Smitha SL, Nissamudeen KM, Gopchandran KG. Aqueous synthesis and characterization of CdS, CdS:Zn²⁺ and CdS:Cu quantum dots. *Spectrochim Acta A*, **2009** 72:827–832
- ¹⁰³ Pradhan N, Efrima S, Single-precursor, one-pot versatile synthesis under near ambient conditions of tunable, single and dual band fluorescing metal sulfide nanoparticles. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125:2050–2051

-
- ¹⁰⁴ . Zheng ChJ, Gao A, He Y, Wu C, Chen G, Kai Y, Zhu XC, Functionalized CdS quantum dots-based luminescence probe for detection of heavy and transition metal ions in aqueous solution. *Spectrochim Acta A*, **2008**, 69:1044–1052
- ¹⁰⁵ Alina Bravo, Juan R. Anaconda, Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties, *Transition Metal Chemistry*, **2001**, 26: 20-23
- ¹⁰⁶ Om P. Sharma and Tej K. Bhat DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, **2009**, 113: 1202–1205.
- ¹⁰⁷ Malgorzata Musialik, Rafal Kuzmicz, Tomasz S. Pawłowski, and Grzegorz Litwinienko, Acidity of Hydroxyl Groups: An Overlooked Influence on Antiradical Properties of Flavonoids *J. Org. Chem. Vol. 74, No. 7*, **2009**
- ¹⁰⁸ (a) Dangles, O.; Fargeix, G.; Dufour, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1999, 1387–1395. (b) Madsen, H. L.; Andersen, C. M.; Jorgensen, L. V.; Skibsted, L. H. *Eur. Food Res. Technol.* 2000, 211, 240–246. (c) Alluis, B.; Dangles, O. *Helv. Chim. Acta* 2001, 84, 1133–1155. (d) Goupy, P.; Dufour, C.; Loonis, M.; Dangles, O. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 615–622. (e) Butkovic, V.; Klasinc, L.; Bors, W. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2816–2820. (f) Tsimogiannis, D. I.; Oreopoulou, V. *Innovative Food Sci. Emerg. Tech.* 2006, 7, 140–146. (g) Villano, D.; Fernandez-Pachon, M. S.; Moya, M. L.; Troncoso, A. M.; Gaecia-Parrilla, M. C. *Talanta* 2007, 71, 230–235. (h) Musialik, M.; Kuzmicz, R.; Pawłowski, T. S.; Litwinienko, G. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 2699–2709.
- ¹⁰⁹ Mario C. Foti, Carmelo Daquino, Gino A. DiLabio, and K. U. Ingold, Kinetics of the Oxidation of Quercetin by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•), *ORGANIC LETTERS* **2011** Vol. 13, No. 18 4826–4829
- ¹¹⁰ Annia Galano, Adriana Pérez-González “On the Free Radical Scavenging Mechanism of Protocatechuic Acid, Regeneration of the Catechol Group in Aqueous Solution” *Theor. Chem. Acc.* **2012**, 131 (9), 1265
- ¹¹¹ L. Lespade, S. Bercion, *Free Radic. Res.* **2012**, 46, 346–358.
- ¹¹² A. Mohajeri, S. S. Asemani, *J. Mol. Struct.* **2009**, 15–20.
- ¹¹³ A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy., A Computational Methodology for Accurate Predictions of Rate Constants in Solution: Application to the Assessment of Primary Antioxidant Activity *J. Comput. Chem.* **2013**, 34, 2430–2445.
- ¹¹⁴ H. Sies, Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol.* **1997**, 82, 291.
- ¹¹⁵ P. Terpin, H. Abramovic, A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids, *Food Chem.* **2010**, 121, 366.

-
- ¹¹⁶ Okuno, Y. "Theoretical Investigation of the Mechanism of the Baeyer-Villiger Reaction in Nonpolar Solvents" *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 210.
- ¹¹⁷ Benson, S.W. "The foundations of chemical kinetics" Malabar, Florida: Krieger; **1982**.
- ¹¹⁸ Eyring, H. "The Activated Complex in Chemical Reactions" *J. Chem. Phys.*, **1935**, *3*, 107.
- ¹¹⁹ Evans, M. G.; Polanyi, M. "Some applications of the transition state method to the calculation of reaction velocities, especially in solution" *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875.
- ¹²⁰ Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. "Current status of transition-state theory" *J. Phys. Chem.*, **1983**, *87*, 2664.
- ¹²¹ Marcus, R. A. "Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory" *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1964**, *15*, 155.
- ¹²² Marcus, R. A. "Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)" *Rev. Mod. Phys.*, **1993**, *65*, 599.
- ¹²³ Marcus, R. A. "Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)" *Pure & Appl. Chem.*, **1997**, *69*, 13.
- ¹²⁴ Truhlar, D. G.; Kuppermann, A. "Exact tunneling calculations" *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 1840.
- ¹²⁵ Collins, F. C.; Kimball, G. E. "Diffusion-controlled reaction rates" *J. Colloid Sci.*, **1949**, *4*, 425.
- ¹²⁶ Smoluchowski, M. "Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösnnge" *Z. Phys. Chem.*, **1917**, *92*, 129.
- ¹²⁷ Truhlar, D. G. "Nearly Encounter-Controlled Reactions: The Equivalence of the Steady-State and Diffusional Viewpoints" *J. Chem. Educ.*, **1985**, *62*, 104.
- ¹²⁸ Einstein, A. "On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat" *Annalen der Physik. (Leipzig)*, **1905**, *17*, 549.
- ¹²⁹ Stokes, G. G. "On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums: PART I - Analytical Investigation" *Mathematical and Physical Papers*, **1903**, *3*, 55.

16 Anexos

Anexo 1 Reactivos

Todas las sustancias utilizadas son de grado analítico, Quercetina, Kaempferol, Morina, Miricetina, Mangiferina, Curcumina, DPPH, Fosfato de Sodio (monobásico y dibásico) Ácido Acético, Ácido Fosfórico, Ácido Bórico, Hidróxido de Sodio, Metanol, Parabenzoquinona, Ácido Vanílico, Ácido Gálico, DCPI, Ácido Ascórbico, Ácido Mercaptoacético, Sulfuro de Sodio, Cloruro de Cadmio, Fenol, Catequina, Genisteina, Hesperetina, Ácido Rosmarínico, Catecol, Beta Caroteno, Xantona, Ibuprofeno, Amoxicilina, Dopamina, Hidroquinona, obtenidas en Sigma-Aldrich. Se utilizó agua desionizada 18 MΩ con un equipo Milli-Q Millipore para todas las soluciones

Anexo 2 SQUAD

Para llevar a cabo la determinación de las constantes de formación de cada una de las especies químicas, se ha desarrollado una serie de programas computacionales, los cuales requieren una propiedad que se mide experimentalmente. Un ejemplo de ello es el programa computacional SQUAD (Stability Quotients from Absorbance Data).

SQUAD es un programa creado por Legget escrito en lenguaje FORTRAN. Está diseñado para refinar constantes de equilibrio a partir de un modelo químico propuesto (puede ser dependiente o independiente del pH), a partir de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y a diferentes composiciones químicas del sistema.

Para el cálculo de las constantes, el programa emplea una aproximación de mínimos cuadrados, mediante el algoritmo de Gauss-Newton:

$$U = \sum_{I=1}^J \sum^{NW} (A^{T}_{i,k} - A^{E}_{i,k})^2$$

Donde:

I = todas las soluciones.

NW = todas las longitudes de onda.

$A^{T}_{i,k}$ = absorbancia calculadas por SQUAD en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

$A^{E}_{i,k}$ = absorbancia experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

Para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer, para lo cual SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar (ϵ) por especie presente y determina la concentración de cada uno empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

Los parámetros estadísticos que emplea SQUAD para determinar si el modelo químico propuesto reproduce la información experimental alimentada son los siguientes:

- ❖ Parámetro de correlación.
- ❖ Desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{datos}) y del as constantes (σ_{cte}).
- ❖ Desviación estándar por espectro (σ_{esp}).
- ❖ Desviación estándar de sobre los coeficientes de absorptividad molar (σ_{coef}).

σ_{datos} es un indicativo de la validez del modelo químico propuesto, por lo que para obtener datos confiables se espera que esta desviación este dentro del intervalo de ± 0.0001 a ± 0.0004 .

Cabe considerar que el análisis estadístico depende en gran medida de la precisión del equipo empleado, la cantidad de datos alimentados al programa y sobre todo de la complejidad del sistema que se estudia.

El proceso de selección del mejor modelo químico no se basa solamente en la obtención de los mejores parámetros estadísticos, también se debe verificar la consistencia del mismo. Es decir, que los coeficientes de absorptividad molar calculados para cada una de las especies sean congruentes con el comportamiento experimental y que las especies refinadas puedan predominar bajo las condiciones experimentales trabajadas.

Aunque comúnmente se utiliza la palabra “refinar” para referirse a un modelo que converge bien en SQUAD, en realidad la cantidad de trabajo que existe detrás de esta palabra es mayor a la que aparenta. Esto se debe a que el experimentador debe cambiar el modelo químico propuesto para refinar cada uno de ellos y analizar

la consistencia de los refinamientos obtenidos con los resultados experimentales. Así, un “refinamiento” de la especiación de un sistema implica cientos de corridas diferentes del programa.

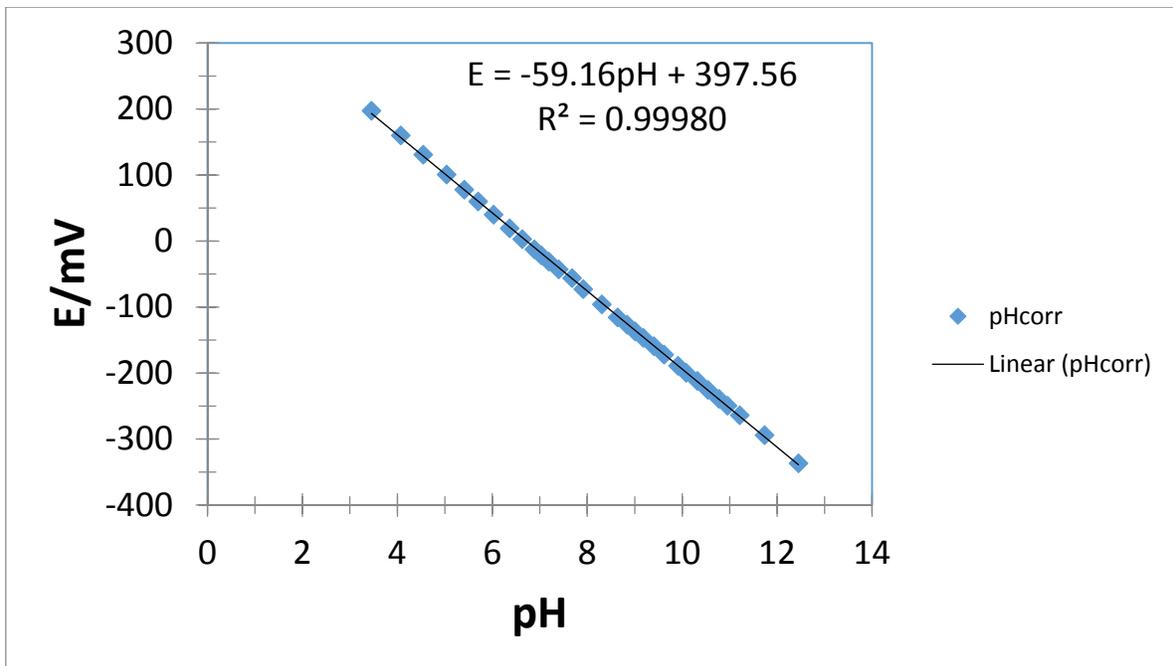
Anexo 3. Corrección de Valores de pH

Los valores de pH obtenidos experimentalmente fueron corregidos por medio de la eficiencia de la celda de acuerdo con la ecuación A1

$$pH_{corr} = pH_{ex} + \left[\frac{pH_{cal} - pH_{ex}}{pH_{cal}} \right] * E_f$$

Donde pH corr representa el valor de pH corregido, pH ex es el valor de pH medido experimentalmente, pH cal es el pH de calibración del electrodo de vidrio y Ef es el factor de eficiencia de celda.

A continuación se muestra un ejemplo de la corrección obtenida para el Kaempferol. Como se puede observar en la gráfica al corregir por la eficiencia de la celda se obtiene una pendiente nerstiana.



Anexo 4 Curvas de calibración de Miricetina, Morina y Kaempferol en presencia de CdS

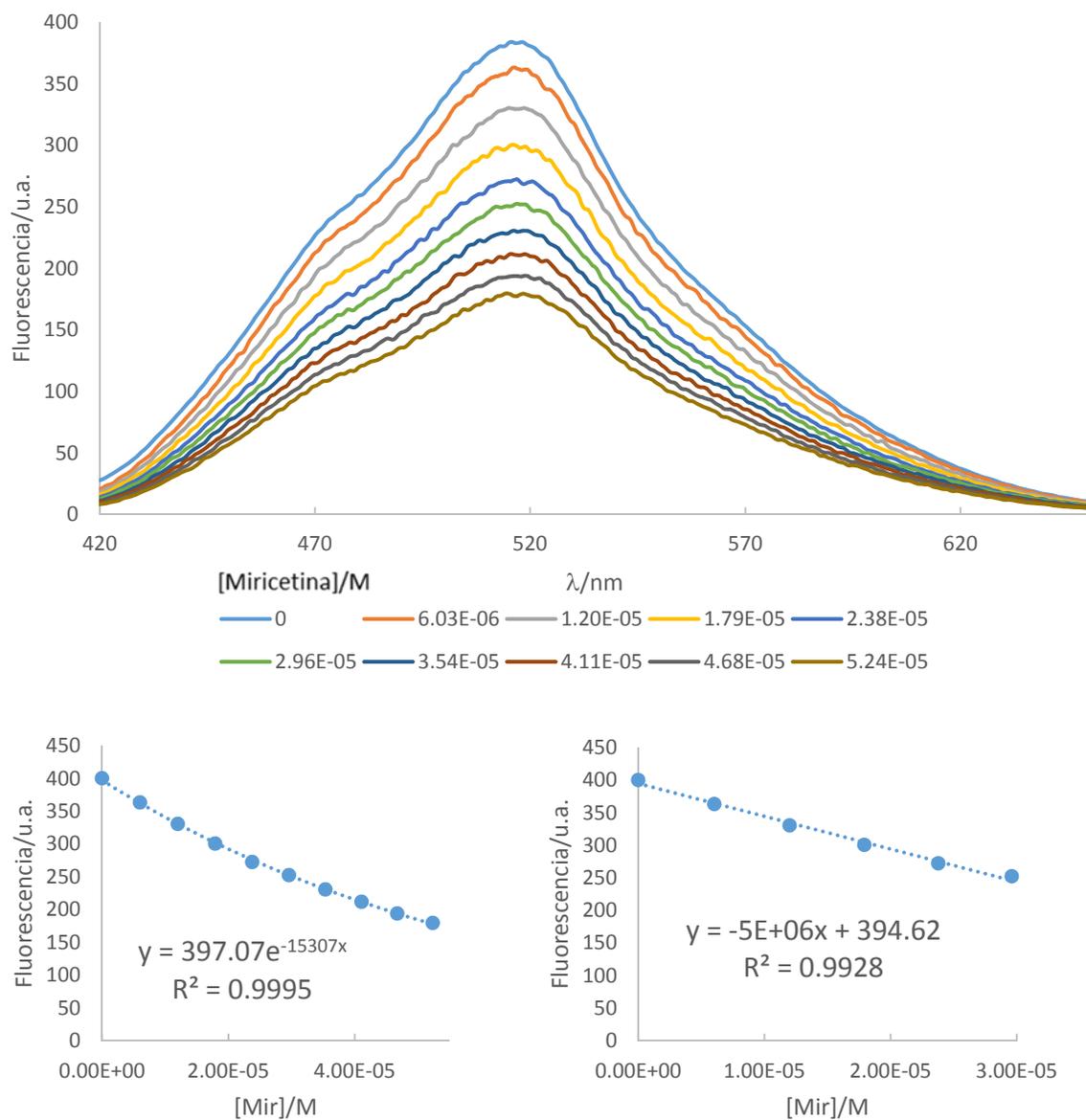


Figura A1. Espectros de emisión de la Miricetina a varias concentraciones en presencia de CdS (a) curva de calibración exponencial de 0 a 5.24×10^{-5} M de Miricetina (b) y curva de calibración lineal de 0 a 2.96×10^{-5} M (c).

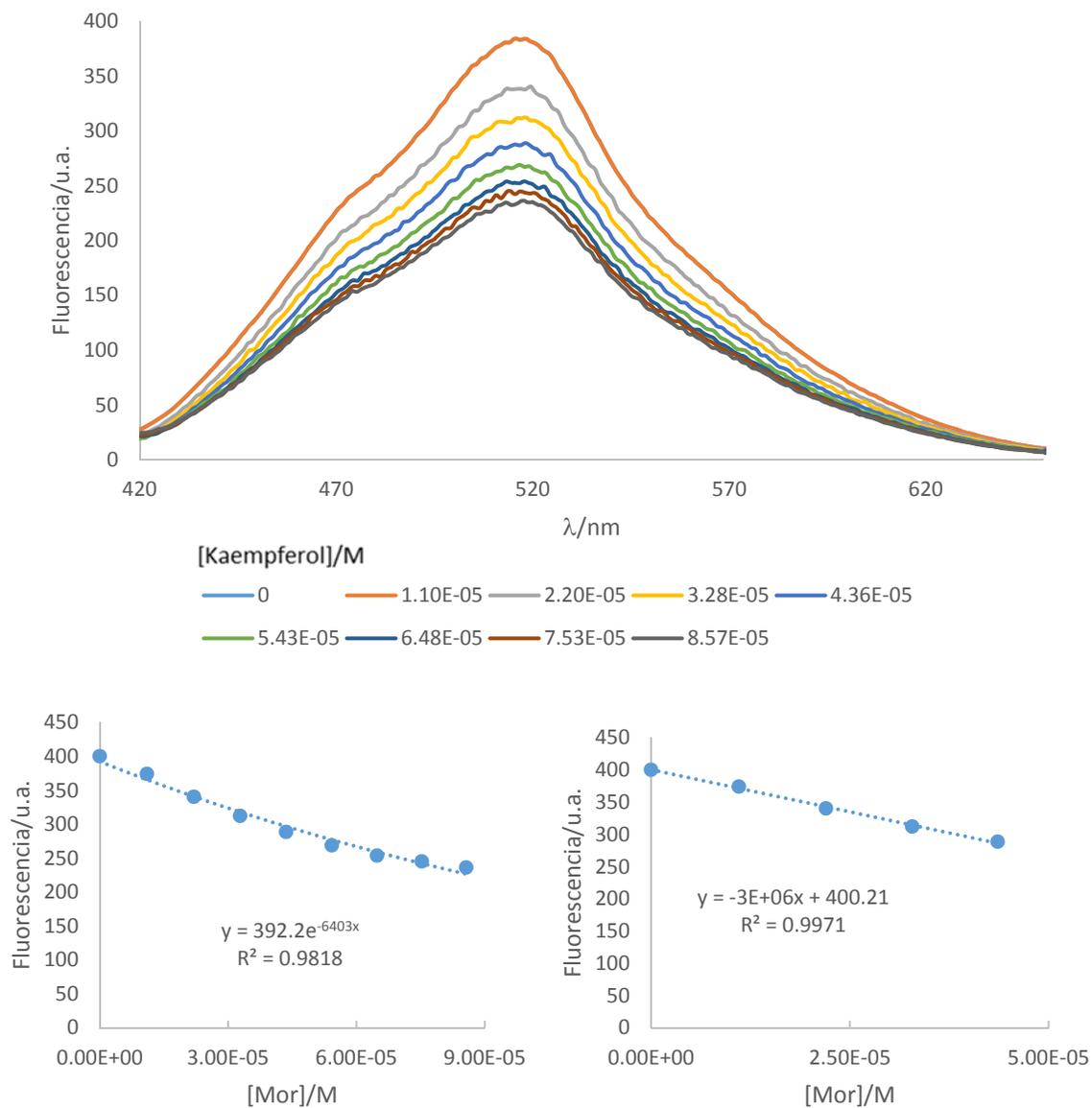


Figura A2 Espectros de emisión del Kaempferol a varias concentraciones en presencia de CdS (a) curva de calibración exponencial de 0 a 8.57×10^{-5} M de Kaempferol (b) y curva de calibración lineal de 0 a 4.36×10^{-5} M (c)

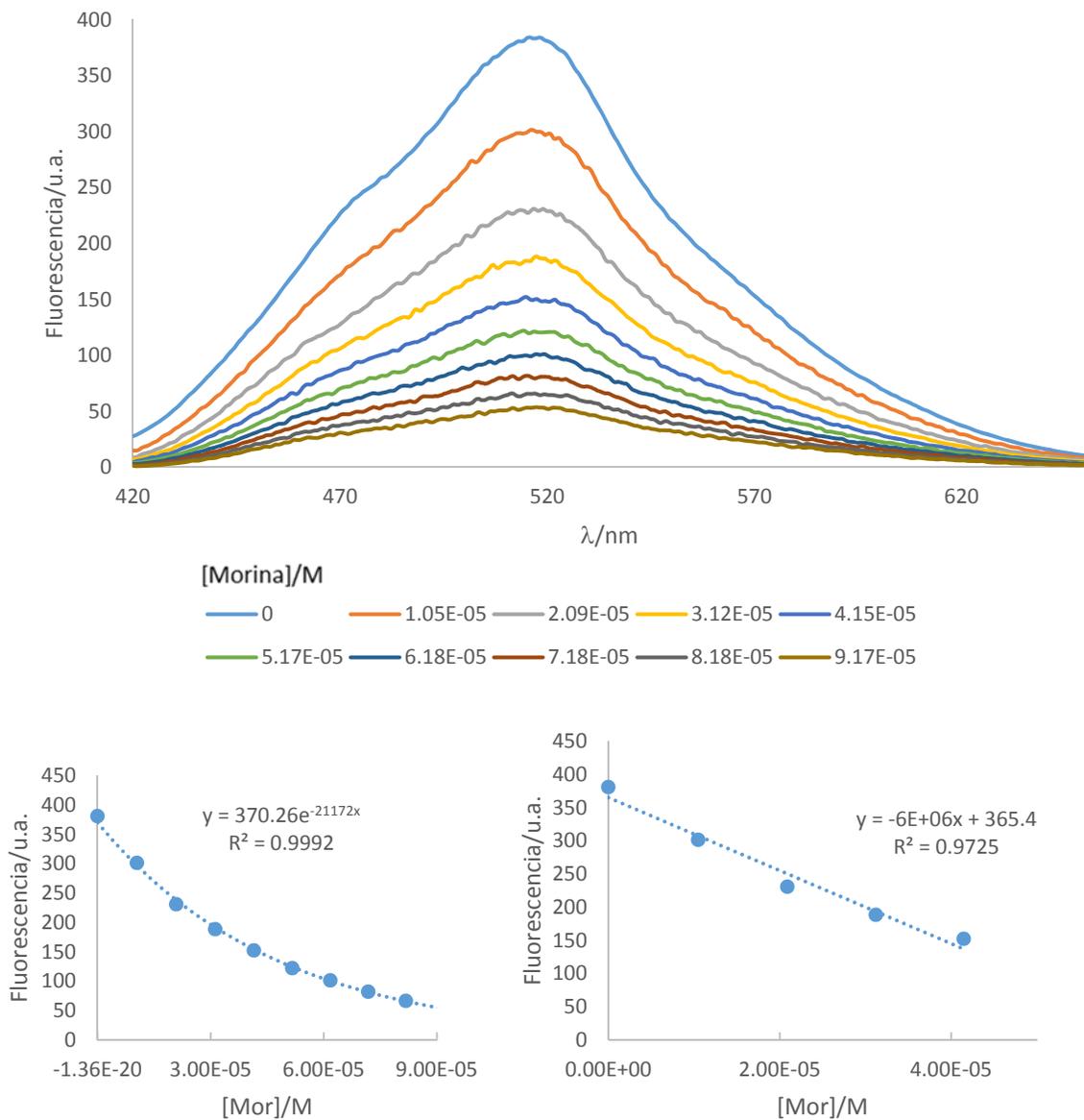


Figura A3 Espectros de emisión de la Morina a varias concentraciones en presencia de CdS (a) curva de calibración exponencial de 0 a 9.17×10^{-5} M de Morina (b) y curva de calibración lineal de 0 a 4.14×10^{-5} M (c)

Anexo 5 Inhibición de CdS en presencia de varios compuestos sin restar la fluorescencia intrínseca.

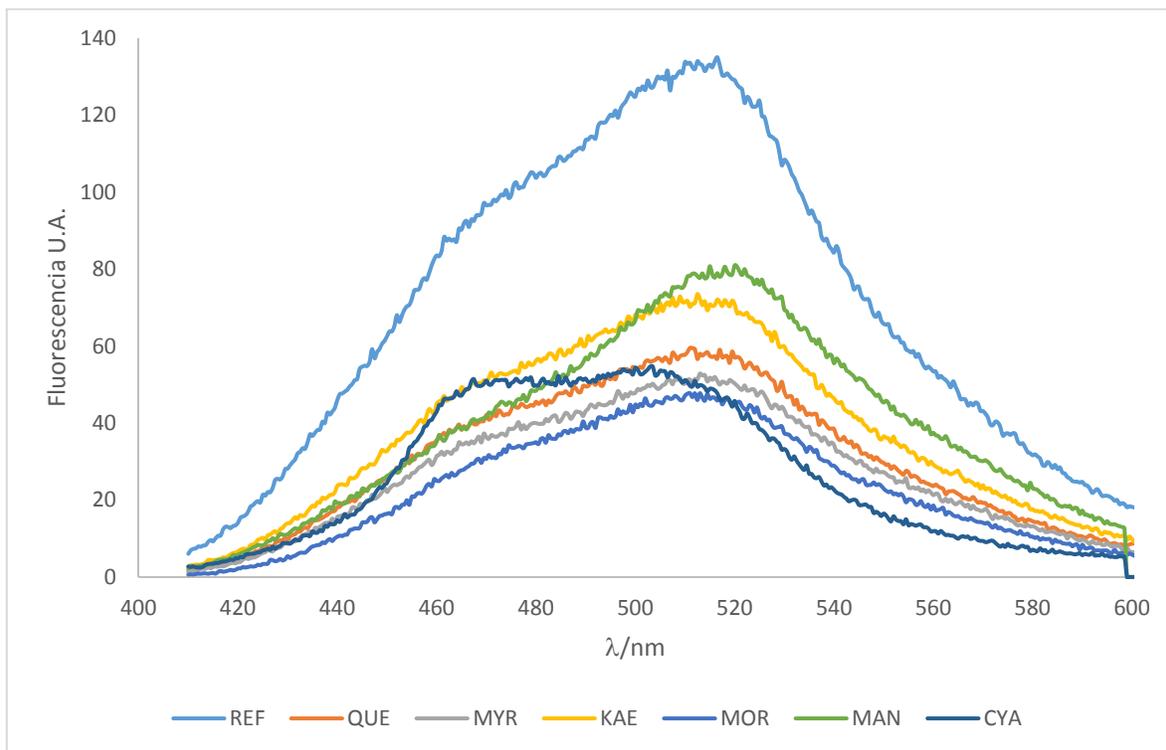


Figura A4. Espectros de emisión de los CdS en presencia de los compuestos que inhiben la fluorescencia, sin restar la fluorescencia intrínseca.

Anexo 6. Comportamiento del DPPH con Morina en metanol/Buffer de fosfatos 80/20.

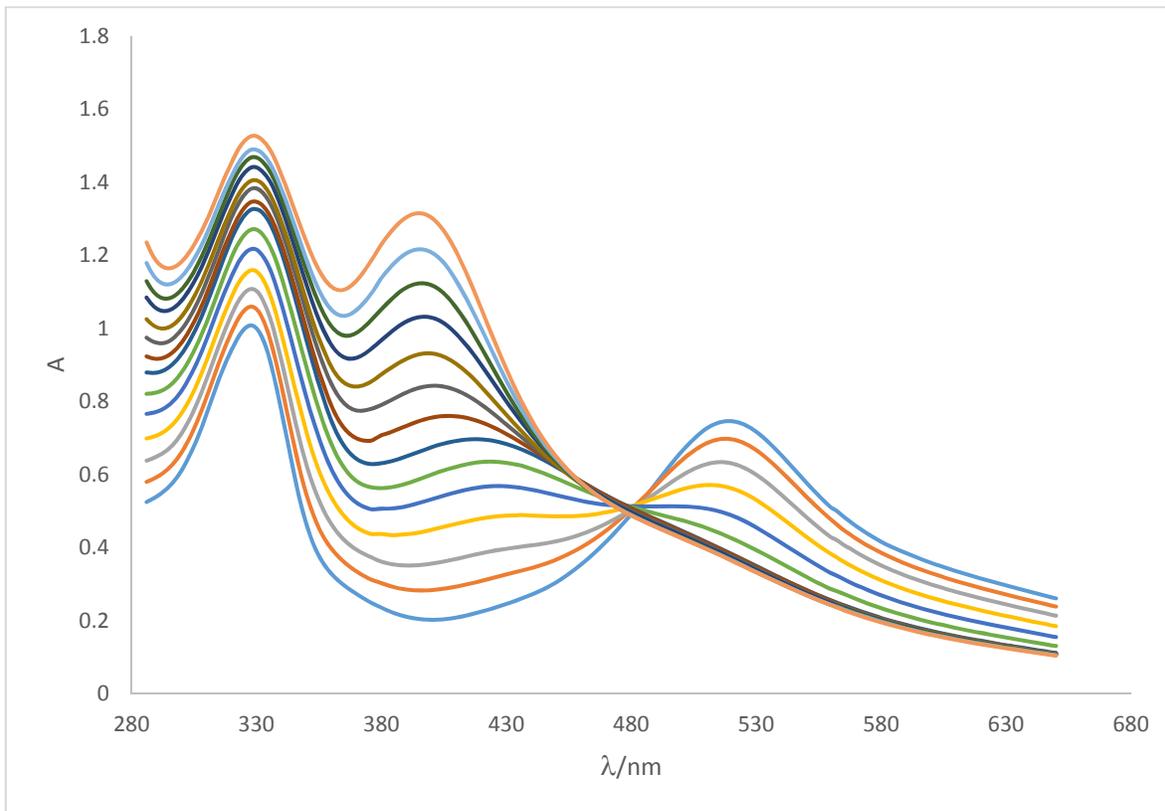


Figura A5. Grafica del DPPH con Morina a diferentes concentraciones en Metanol/agua 80/20 con Buffer de Fosfatos 0.05M a ph 7.4

En la figura A5 se observa el comportamiento en buffer de fosfatos para la reacción del DPPH con la Morina, se puede ver como a diferencia de las que no contienen el buffer deja de existir una disminución en la absorbancia del DPPH después de cierto número de adiciones. También se observa un incremento en la absorbancia a 400nm aprox correspondiente con la señal de Morina a ese pH. Lo cual indica que se terminó el DPPH y la señal en 520nm se debe a otros productos mas la interacción de ellos con el buffer o llega un momento en el cual ya no hay reacción entre la Morina y el DPPH. Lo mismo ocurre en el caso de la Quercetina.

Anexo 7. Separación en las bandas espectrales de los reactivos para el DPPH y la Morina.

Se puede apreciar en la Figura A6 como no hay un solapamiento de señales a 520nm a ese pH en presencia del buffer cuando las sustancias no están mezcladas, se observa en Naranja la señal de la Morina y en Azul el DPPH por separado.

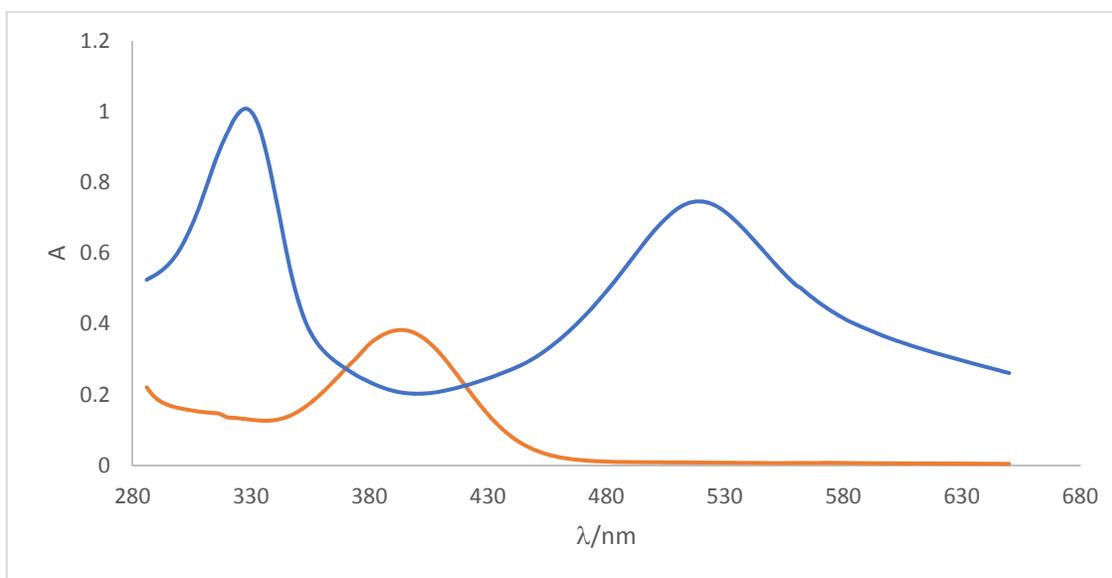


Figura A6. Espectro del DPPH en azul y espectro de Quercetina en Naranja

Anexo 8. Pruebas de solvente del método del DPPH

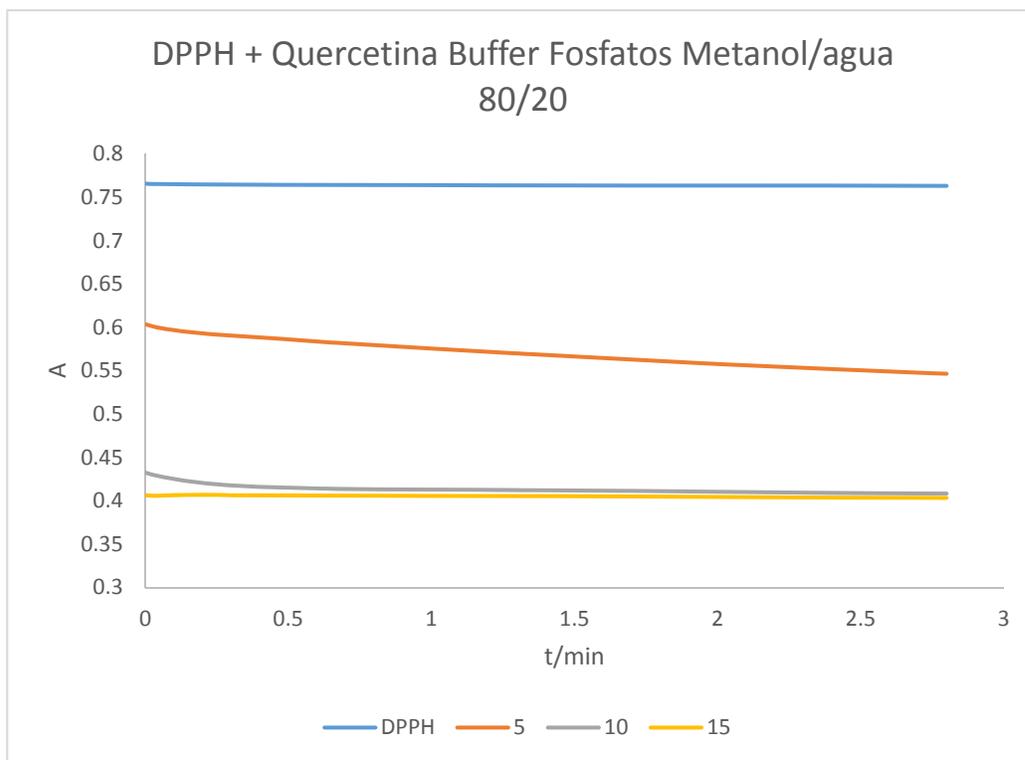


Figura A7. Cinética de DPPH con Quercetina en Buffer de fosfatos a diferentes concentraciones de Quercetina.

Se realizaron experimentos en etanol y metanol y mezclas con agua para determinar cual combinación es más eficiente, a continuación se muestra una gráfica que revela que el metanol es mejor solvente para la reacción de la Quercetina con el DPPH.

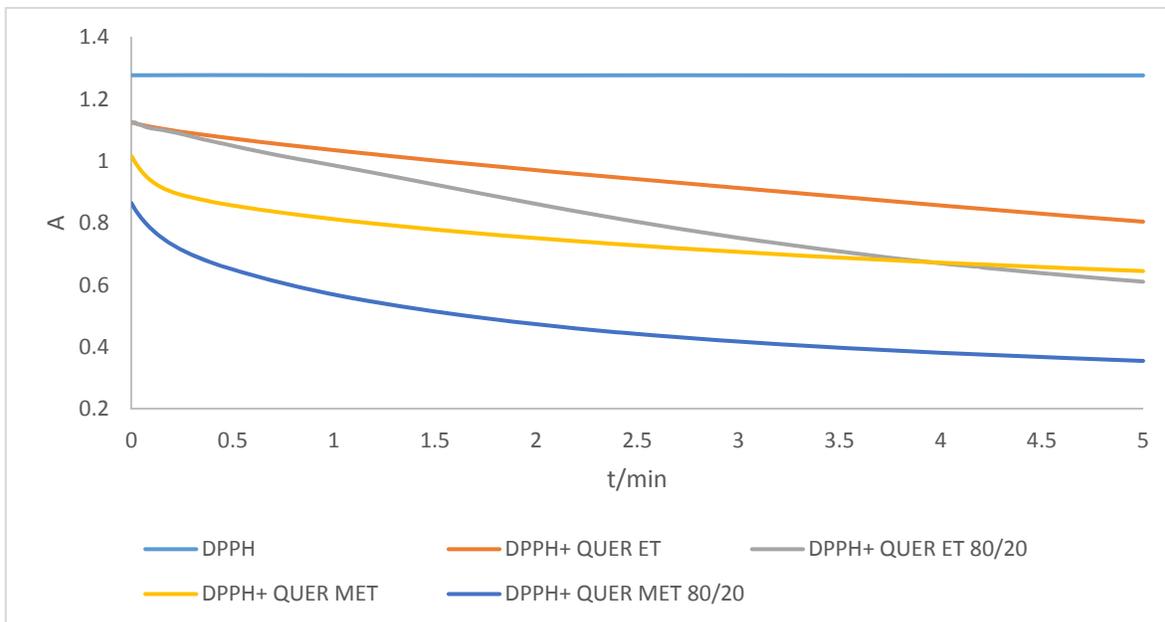


Figura A8. Cinética de DPPH y Quercetina en etanol, etanol/agua 80/20, metanol y metanol/agua 80/20.

Se muestra además otra gráfica cambiando las proporciones de la mezcla: 100% metanol Metanol agua 80/20, Metanol Agua 70/30, para la reacción de la Quercetina con el DPPH. Se observa como la mezcla 70/20 comienza a perder eficiencia.

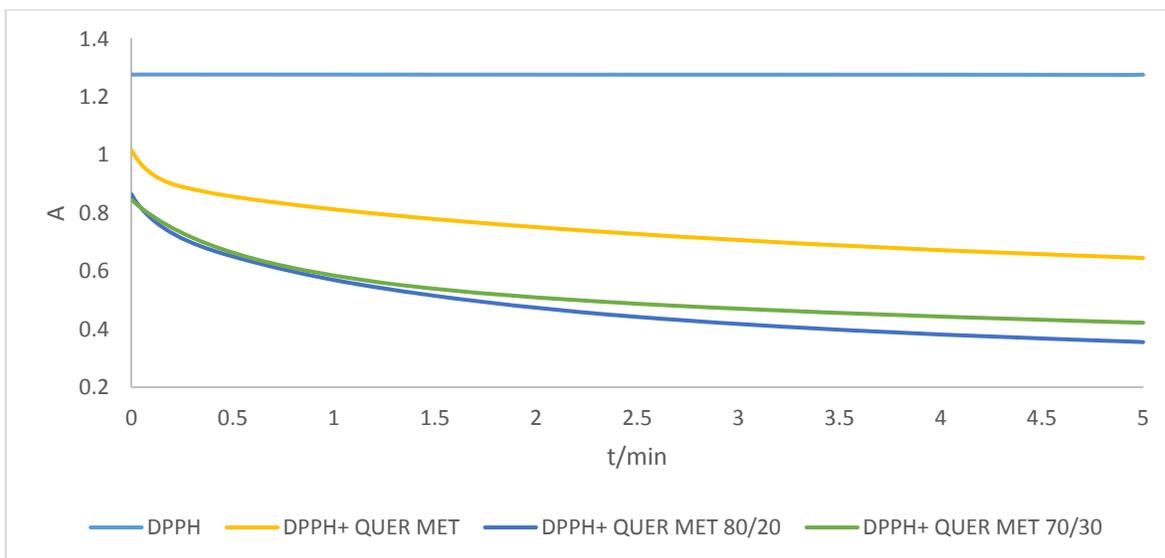


Figura A9. Cinética de DPPH con Quercetina en mezclas Metanol/Agua a diferentes proporciones

Lo mismo ocurre con la Morina y el DPPH solo que en el caso del etanol, no hay cambios si se hace una mezcla con agua. Figura A10

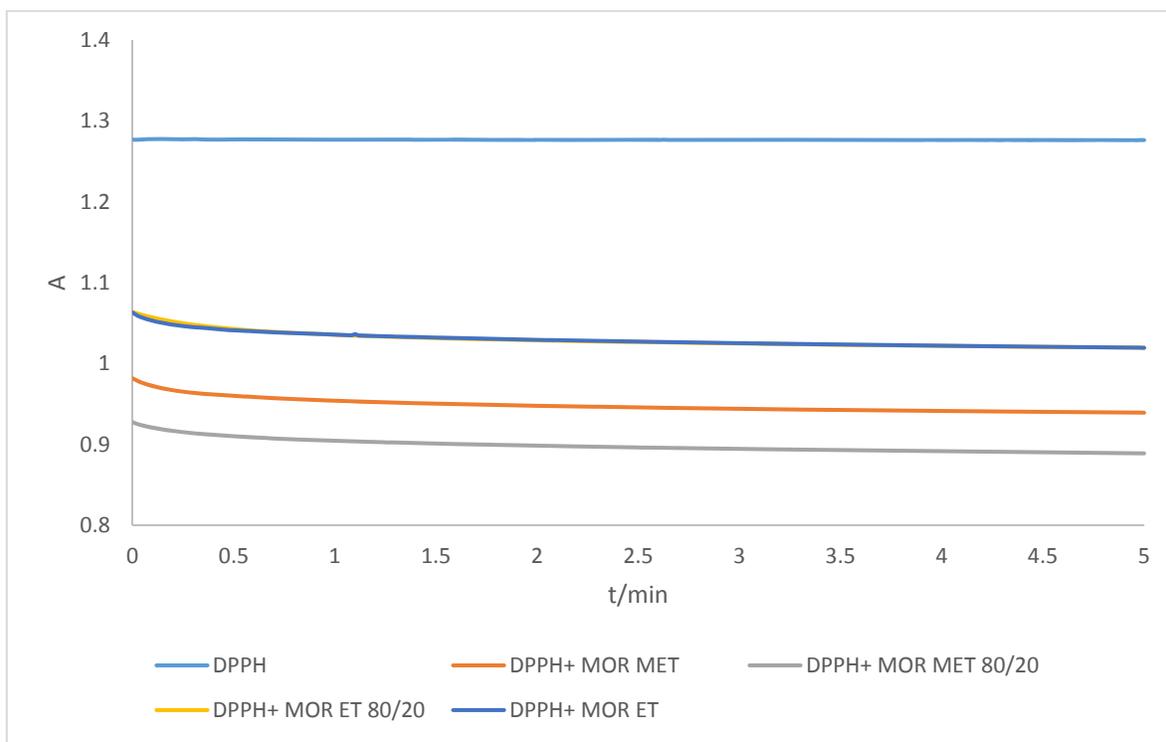


Figura A10. Cinética de DPPH y Quercetina en etanol, etanol/agua 80/20, metanol y metanol/agua 80/20.

Anexo 9. Curvas de Calibración de DPPH con Mangiferina y Curcumina

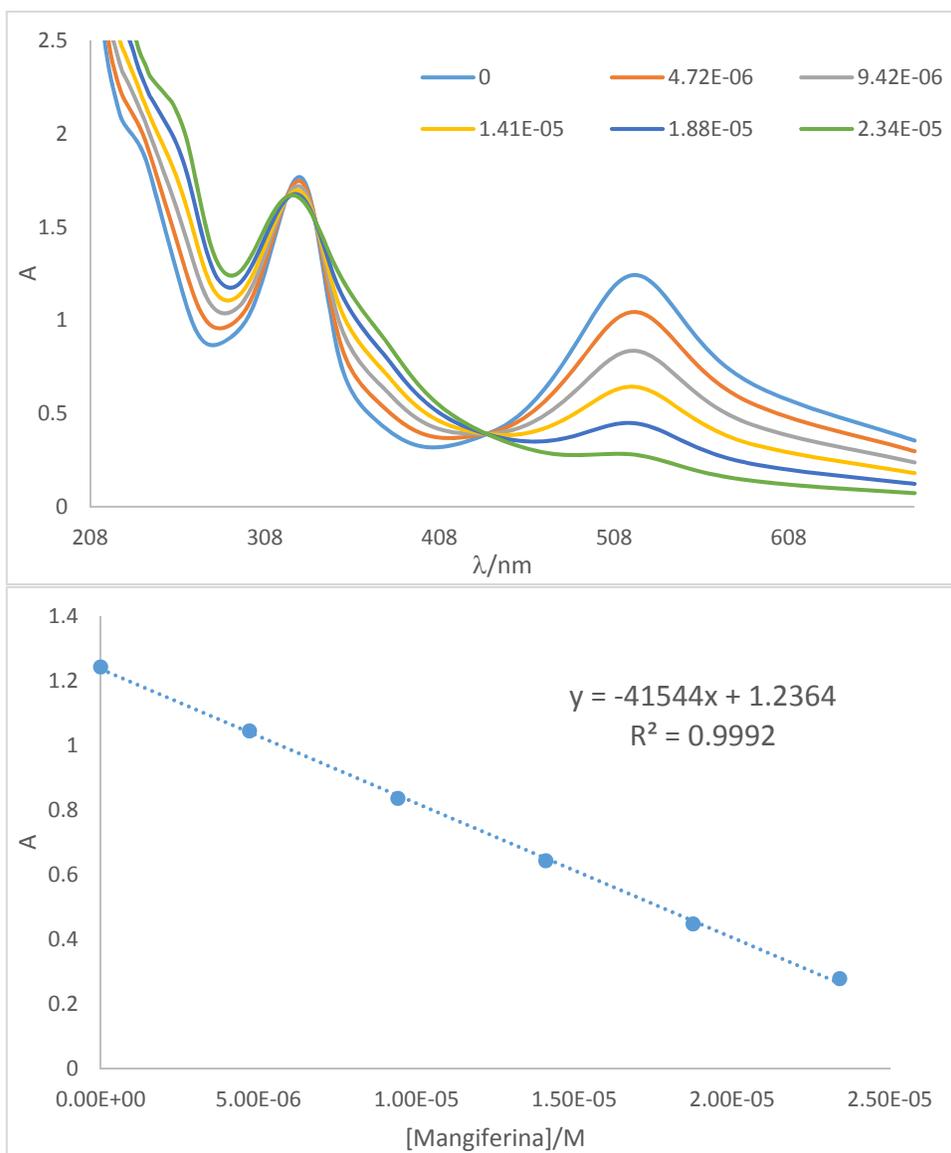


Figura A11. Espectros de absorción de DPPH a varias concentraciones de Mangiferina y la curva de calibración correspondiente.

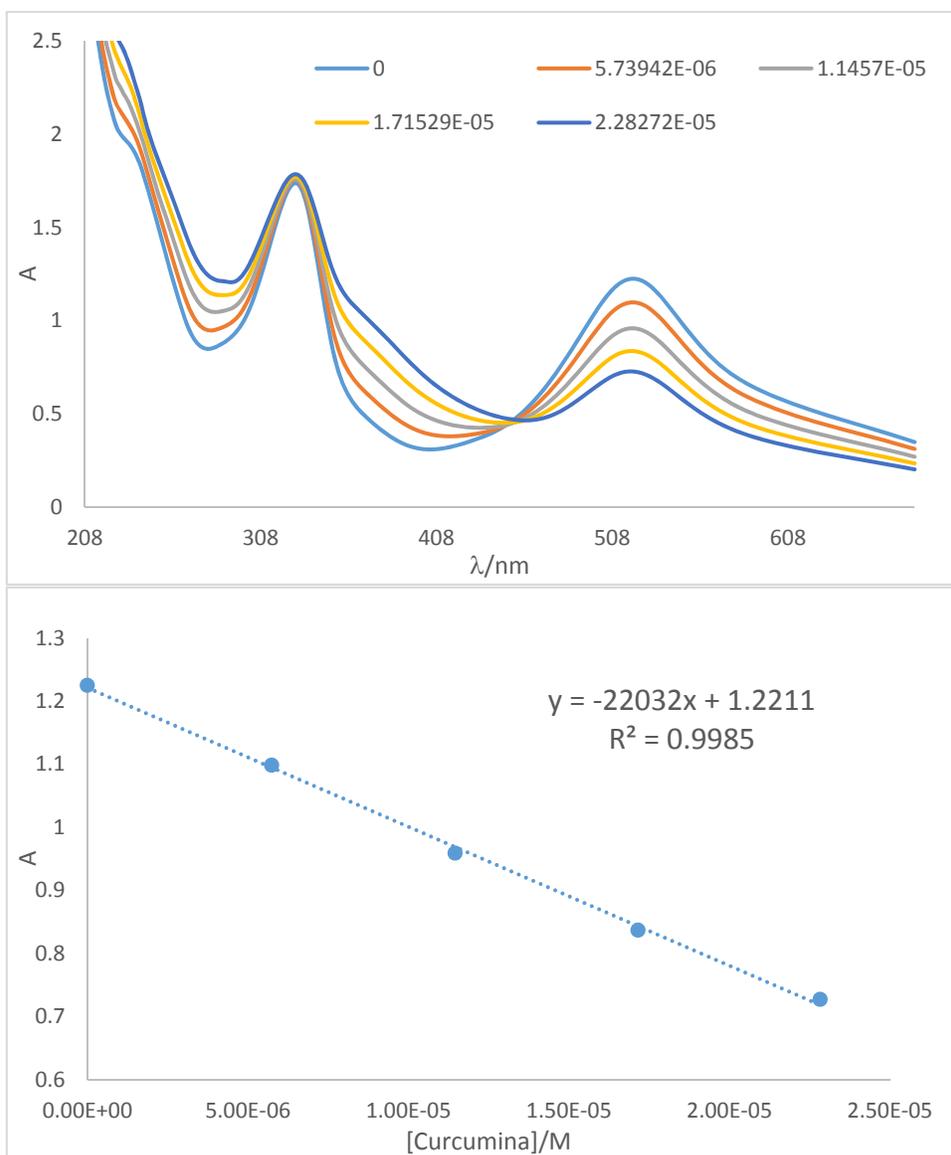


Figura A12. Espectros de absorción de DPPH a varias concentraciones de Curcumina y la curva de calibración correspondiente.

Anexo 10. Cinética de reacción de Quercetina con DPPH de 0 a 35min

La figura A13 muestra el comportamiento de la reacción de Quercetina con DPPH durante 35 min, se observa que todavía a este tiempo, la reacción continúa evolucionando.

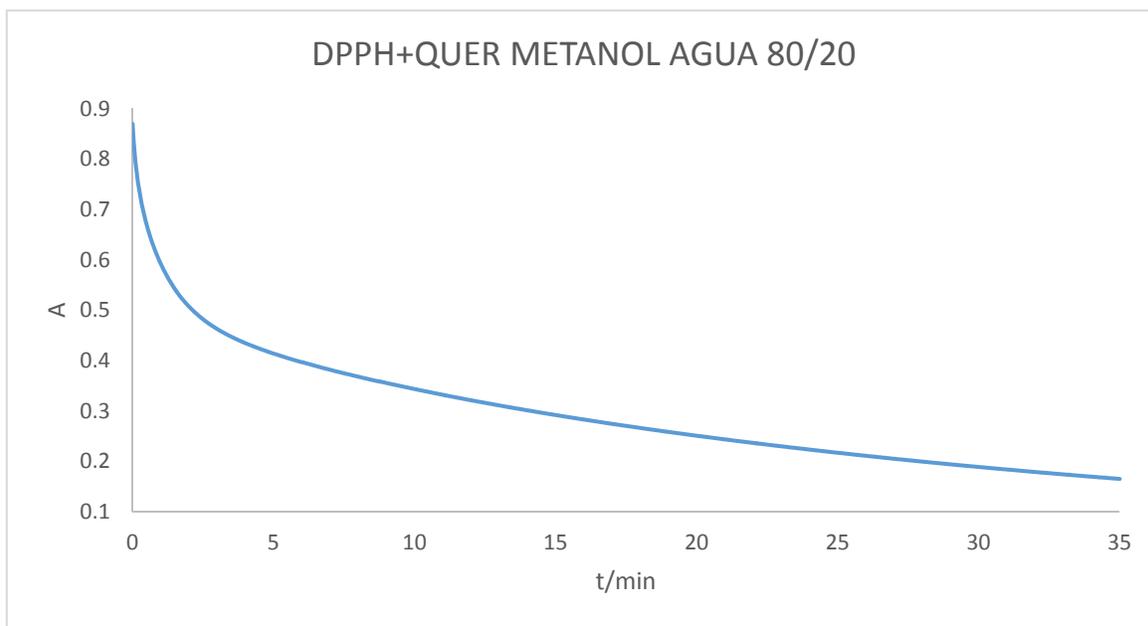
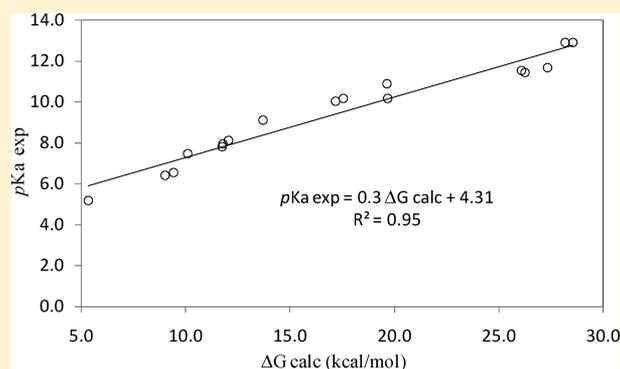


Figura A13. Cinética DPPH y Quercetina en mezcla metanol/agua 80/20 de 0 a 35 min.

Deprotonation Mechanism and Acidity Constants in Aqueous Solution of Flavonols: a Combined Experimental and Theoretical Study

Ruslán Álvarez-Diduk,[†] María Teresa Ramírez-Silva,^{*,†} Annia Galano,[†] and Arben Merkoçi[‡][†]Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, México D. F. 09340, Mexico[‡]ICREA & ICN2—Institut Catala de Nanociencia i Nanotecnologia, Campus UAB, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

ABSTRACT: Four flavonols, namely quercetin, morin, kaempferol, and myricetin, were studied using spectrophotometry (UV–vis) in aqueous solution. The study was performed varying the pH to analyze the stability of these compounds, and to estimate their acidity constants. In addition, the deprotonation mechanisms were studied using computational chemistry within the density functional theory framework. The calculations were performed in aqueous solution using the SMD continuum model, and the results are reported as deprotonation energies. Our results show that both quercetin and myricetin are highly unstable at basic pH. Kaempferol, on the other hand, is much more stable, and morin is the only one among the studied compounds that was not affected by pH. In spite of this inconvenience, their acidity constants were estimated through analysis of their decomposition kinetics, correcting the spectra accordingly, and obtaining a correlation of values between the experimentally observed pK_a and the calculated ΔG of successive deprotonations.



INTRODUCTION

Polyphenols are versatile, ubiquitous substances frequently consumed in the human diet through a wide variety of foods and beverages, such as fruits, vegetables, wine, coffee, tea, beer, and so forth.^{1,2} These compounds have been identified to play multiple biological roles,^{3,4} including cardioprotective^{5–8} effects and anti-inflammatory,^{9,10} antimicrobial, and antiviral¹¹ activities. They are also used to prevent and treat cancer^{12,13} and neurodegenerative diseases^{14,15} and to prevent skin damage¹⁶ and osteoporosis.¹⁷ They are also reported to have excellent antioxidant activities.^{18–27}

Due to the presence of several OH phenolic groups in their structures, polyphenols are also expected to have several acidity constants in aqueous solution, which are most frequently expressed as pK_a values. This means that depending on the pH of the environment, their preponderant acid–base form can change, and consequently, their chemical properties would also be different. For example, there are previous studies demonstrating that pH influences the antioxidant activity of different chemical compounds because of the relative abundance of their acid–base forms.^{28–30} The pH varies from 1.5 to 8 within human body; for instance, it is 1.5 in the stomach, 5.3 in the intestine, 6.4 in the saliva, and 7.4 in the bloodstream.³¹ Thus, as the case is for any other compounds involved in acid–base equilibria, it is vital to accurately know the population of the different forms to properly understand their activity. This is particularly important for drugs because although the ionic forms increase the solubility

in the aqueous phase, the neutral forms are susceptible to passive transfer through the biological membranes.³²

There are several experimental techniques that have been proven to be successful to measure pK_a s. Among these, the ones most frequently used to that purpose are potentiometry,³³ spectrophotometry,^{34,35} capillary electrophoresis (CE),³⁶ and nuclear magnetic resonance (NMR).³⁷ Their relative efficiency for determining pK_a s depends on the chemical nature of the compounds studied, their solubility, and also the stability of the species involved under the experimental conditions, although in the case of chemical species containing a catechol group, a low stability has been observed at basic pH, as in the case of dopamine.³⁸ Therefore, it is crucial to perform previous studies on these aspects before choosing one of these techniques. In general, the experiments based on potentiometry, CE, and NMR take a relatively long time; thus, they are not recommended for species with low stability. In such cases, the UV–vis spectrophotometry technique, if properly designed, can be the best option. In addition, the results obtained that way can be refined with computational codes such as Stability Quotients from Absorbance Data (SQUAD).^{39,40}

The latter technique was used in the present work to determine the pK_a values of four flavonols. This family of compounds has been chosen because flavonols are the most abundant dietary

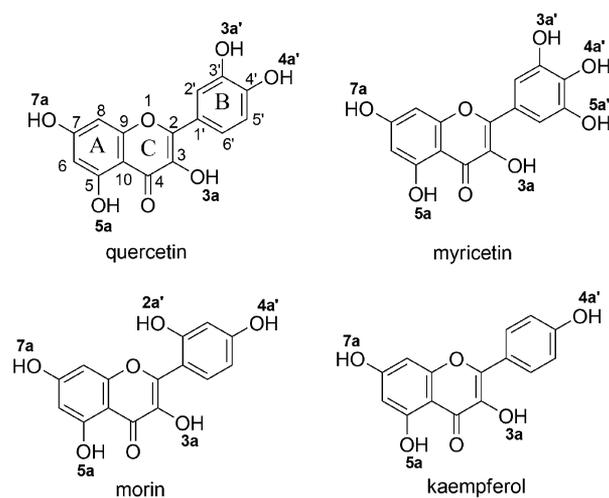
Received: May 21, 2013

Revised: September 22, 2013

Published: September 24, 2013

polyphenols. Among them, quercetin (H_5Qct , Scheme 1) is probably the most widely studied so far, having two OH groups

Scheme 1. Structure and Numbering of the Flavonols Studied in This Work



in the B ring. However, it is important to note that the chemical behavior and biological activities of this kind of compounds have been related to the number and position of the OH groups present in the B ring.^{41–48} Accordingly, the other flavonols chosen for the present study, namely morin (H_5Mor), myricetin (H_6Myr), and kaempferol (H_4Kmp) (Scheme 1), differ from quercetin in the number and location of the OH groups in the B ring.

On the basis only of their structures, in particular on the number of phenolic OH groups, the existence of at least four pK_a values for kaempferol, five pK_a values for quercetin and morin, and six pK_a values for myricetin can be hypothesized. However, not all of them have been identified yet. Tyukavkina and Pogodaeva reported two pK_a values for kaempferol,⁴⁹ whereas Herrero-Martinez et al.⁵⁰ measured three pK_a values for this compound when using CE and proposed four values using SPARC computational code (see Table 1). The latter data seem

Table 1. pK_a Values from Literature

flavonol	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$	$pK_{a,4}$	method ^a	ref
kaempferol	8.2	9.5			3 $I = 0.1$	49
	7.05	9.04	11.04		2 $I = 0$	50
	7.11	9.09	11.33	13.26	4 $I = 0$	50
morin	3.46	8.1			3	51
	4.99	8.23	10.34		1 $I = 0$	52
	5.06	8.64	10.62		2 $I = 0$	50
	6.93	8.32	9.98	11.98	4 $I = 0$	50
quercetin	7.3	8.4			3 $I = 0.1$	49
	6.62	9.7			1	53
	7.19	9.36	11.56		2 $I = 0$	50
	6.74	9.02	11.55		3	51
	7.71	9.44	11.46		1 $I = 0$	52
	7.59	9.33	11.56		$I = 0$	52
	7.04	8.55	11.26	13.06	4 $I = 0$	50

^a1 = potentiometry, 2 = CE, 3 = spectrophotometry, 4 = SPARC, I = ionic strength.

to be complete because it comprises as many pK_a s as there are phenolic OHs in kaempferol. The largest discrepancy is for

$pK_{a,1}$ equal to 1.15 pK_a units, which is unusually large; however, this has not been explained so far.

Four sets of pK_a s have been previously reported for morin. Slobodan et al.⁵¹ reported two pK_a s values, whereas Herrero-Martinez et al. have found three^{50,52} and four values⁵⁰ depending on the technique used. In this case, the largest discrepancies also corresponded to $pK_{a,1}$; however, they are even larger than in the case of kaempferol, ranging from 1.53 to 3.47 pK_a units. Such dispersion of values definitely deserves an explanation. For this particular compound, there are no previous reports that account for all the possible deprotonations of the phenolic OH groups (five).

This is also the case for quercetin, regardless of the large number of works dealing with its acidity constants. This compound has five phenolic OHs; accordingly, it is expected to have five pK_a values. However, in previous work, sets of only two,^{49,53} three,^{50–53} and four⁵⁰ pK_a values have been reported. For these compounds, the discrepancies among the reported data are smaller than those for kaempferol and morin; however, in some cases they are larger than 1 pK_a unit.

In view of the fact that myricetin has been recently reported as one of the best flavonoids for scavenging free radicals⁵⁴ and because there are no pK_a values reported so far, it would seem to be an important issue to address such a lack.

When all the information gathered thus far is considered, it is evident that there is still important data missing on the acid–base equilibria of the aforementioned flavonols. The most relevant relate to the missing pK_a values and on feasible explanations of the discrepancies among the data reported. Over and above, further investigation is also needed regarding the deprotonation order. Even though some efforts have been made in this direction, there is no systematic and detailed study that considers all possible acid forms. There are no demonstrations, either, on the proposed mechanisms of deprotonation, which are assumed to be incomplete for quercetin and morin and are missing for myricetin. In addition, most of the reported pK_a s were obtained using alcohol/water mixtures; thus, there is scarce information on pK_a values obtained in aqueous solution. Accordingly, it is the main goal of the present study to provide as much information as possible regarding these aspects. For such a purpose, a combined experimental–theoretical study has been performed that considers all the possible deprotonation processes.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. All substances used were analytical grade reagents. Quercetin, kaempferol, morin, myricetin, acetic acid, phosphoric acid, boric acid, sodium hydroxide, and methanol were purchased from Sigma-Aldrich (HPLC grade). Deionized water with 18 M Ω resistivity from Milli-Q Millipore equipment was used to prepare all solutions.

Spectrophotometric Study. Solutions Preparation. Stock solutions of quercetin, myricetin, kaempferol, and morin were prepared by dissolving 10 mg of each of these compounds in 10 mL of methanol. The desired amount of Britton Robinson buffer solution, 0.02 M with the pH adjusted previously, was added. All measurements were performed under a nitrogen atmosphere. The final amount of methanol in the solution was 0.7%. The pK_a determination in this work was done at variable ionic strength in the range 0.03 to 0.15.

pH Measurements. pH values were measured with a radiometer potentiometer PHM210 equipped with a CORNING G-P Combo w/Rj Cat. No. 476086.

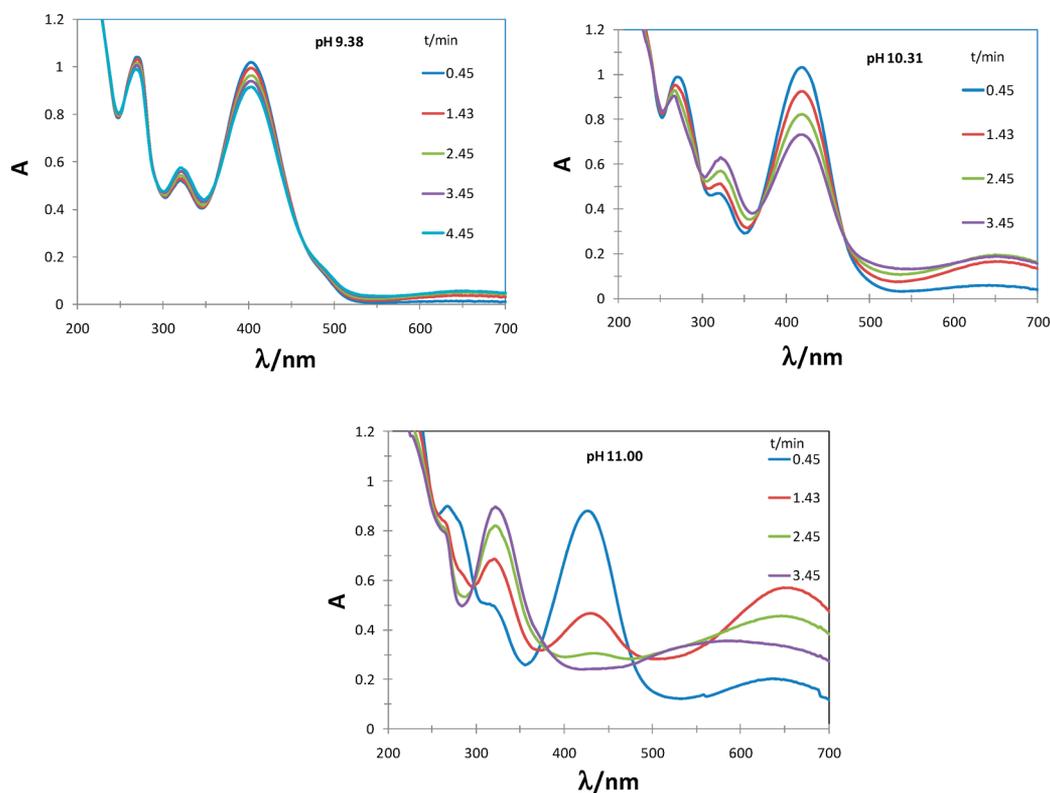


Figure 1. Time evolution of the absorption spectra of myricetin at 5.8×10^{-5} M at different pH values.

Stability Tests. The information from the decomposition of the compounds was obtained using the spectrophotometric data by analyzing changes in the absorption spectra at different times and pH values.

Conditions for the Absorption Spectra Acquisition. Absorption spectrum for each solution was achieved with a Perkin-Elmer Lambda 950 spectrophotometer, using 1 cm path length quartz cells, at 25 °C.

Determination of Equilibrium Constants. The SQUAD^{39,40} program was used in order to obtain the formation constants by fitting UV absorption spectra with the pH and chemical composition of the solutions.

Computational Details. Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the B3LYP functional and the 6-31+G(d) basis set. Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out in solution using the SMD continuum model⁵⁵ and water as the solvent. SMD is considered a universal solvation model, due to its applicability to any charged or uncharged solute in any solvent or liquid medium for which a few key descriptors are known.⁵⁵ This approach has been selected after comparisons with experiments (see following section). Conformational searches were conducted for the orientation of the B ring (Scheme 1) and for the H atom in the phenolic groups. All the electronic calculations were performed with the Gaussian 09 package of programs.⁵⁶ Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies, which have been computed for the 1 M standard state.

The Gibbs free energies of reaction, corresponding to all the deprotonation processes, have been calculated using the Gibbs free energy in aqueous solution derived from experiments for the proton. This approach is based on the knowledge that computational methods poorly reproduce the solvation energies

of H^+ , and it has been previously used with successful results.^{57–63} It should be noted, however, that there are several values reported for the H^+ solvation energy. In this work, we have used $\Delta G_{\text{solv}}(H^+) = -265.89$ kcal/mol, on the basis of the recommendation of Camaioni and Schwerdtfeger.⁶⁴

RESULTS AND DISCUSSION

Stability. In order to obtain reliable results, it is important to consider the physical integrity of the molecules studied during the whole experiment and the stability at different pH values in which the first study was performed, which meant keeping the systems under nitrogen atmosphere and precluded from light incidence.

It was found that morin, at 5.0×10^{-5} M, is stable within the 1.8–13.4 pH range for at least 4 min. It is important to notice that the experiments were conducted for shorter times. For kaempferol, at 3.73×10^{-5} M, the stability study was performed within the 1.8–11.6 pH range. It was found that in a 5 min period at the highest pH, more than 98% of these compounds remain unaltered. The two other compounds are less stable, especially as the pH increases; thus, their stability assays will be described in more detail.

In the case of myricetin, at 5.8×10^{-5} M, the stability study was performed within the 1.8 to 11.6 pH range; at pHs from 1.85 to 8.55, this compound is stable for at least 4 min. At higher pH values, the absorption bands decrease with time (Figure 1). After 4.5 min at pH = 9.38, the intensity of the bands at 420 and 280 nm decrease by 10%, the band at 320 nm becomes more intense, and a new band appears at 650 nm. In a shorter period (3.45 min) at higher pHs, the same trends are observed, but the intensity changes are larger. When the pH was increased to 11, the band at 420 nm disappeared completely after 3.45 min, and the general shape of the spectrum changed dramatically. On the basis of

these results, it can be stated that the estimation of the acidity constants for myricetin cannot be performed using potentiometry in the usual way (continuous titration with NaOH). However, this technique can be still employed, provided that the proper precautions are taken, as will be explained later.

A new plot was created (Figure 2) to estimate the absorption at time zero, the first step of which is to prove that in short periods,

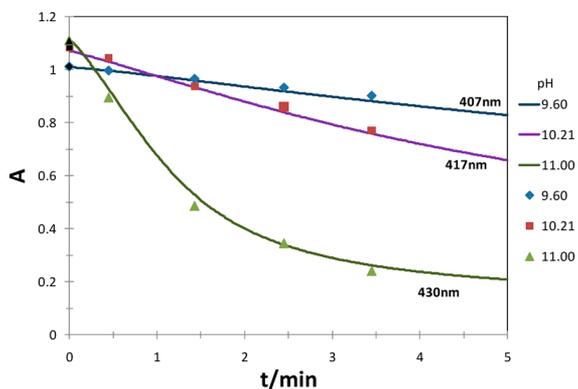


Figure 2. Plots of the absorbance vs time at different pH values for of myricetin at 5.8×10^{-5} M. The black dots correspond to time zero obtained by extrapolation.

there is a linear behavior of absorbance vs time, despite the fact that the molecule is decomposing. The solid lines were obtained through recording the absorbance as a function of elapsed time at specific wavelengths, depending on the pH ($\lambda^{\text{pH}=9.6} = 407$ nm, $\lambda^{\text{pH}=10.21} = 417$ nm, and $\lambda^{\text{pH}=11.0} = 430$ nm), and the points correspond to the spectral data obtained from continuous measurements throughout the UV spectra (Figure 1). The agreement between the data obtained in these two different pathways is a requirement to extrapolate to time zero, which was fulfilled as shown in the figure. Thereafter, using linear extrapolation, the two points corresponding to the shortest times were used to obtain the absorbance values at time zero. This process is then carried out for each wavelength, which allows us to obtain the whole spectrum at time zero. This extrapolation is important because it is impossible to directly obtain such information because recording the spectra is unavoidably a time-consuming process. This laborious work is vital for accurate pK_a value determinations from spectroscopic techniques due to the instability of the molecules studied.

The spectral behavior of quercetin, at 2.46×10^{-5} M, at pH = 11.31 is shown in Figure 3. Initially, two maxima were observed, at 280 nm and 425 nm. However, their intensity decreases as time passes. In addition, a decomposition product, which absorbs at 315 nm, appears. It has been associated with the oxidation of quercetin.⁶⁵ It was found that this compound behaves similarly to myricetin, but with less instability and without the appearance of the band at 650 nm. At pH values between 1 and 9.78, there were no significant changes. However, at pHs ≥ 9.78 , the absorbance decreases, with a loss of 2.3% in 2 min for the absorption maximum. As the pH increases, so does the decomposition rate (Figure 4).

In summary, the stability of the studied compounds was found to have the following trend: myricetin < quercetin \ll kaempferol \ll morin.

Acidity Constants. The acid/base behavior analysis was performed using UV–vis spectrophotometry. The absorption spectra of quercetin (2.46×10^{-5} M), morin (5.0×10^{-5} M),

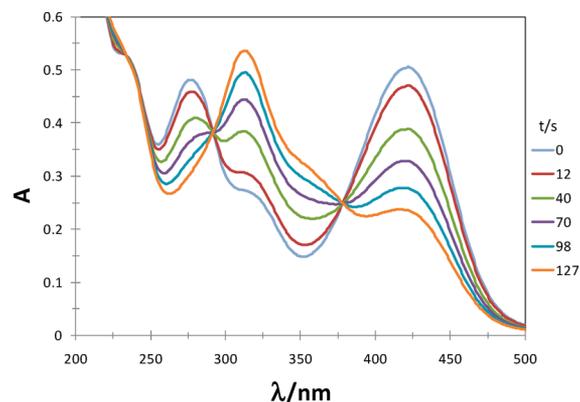


Figure 3. Time evolution of the absorption spectra of quercetin at 2.46×10^{-5} M and pH = 11.31.

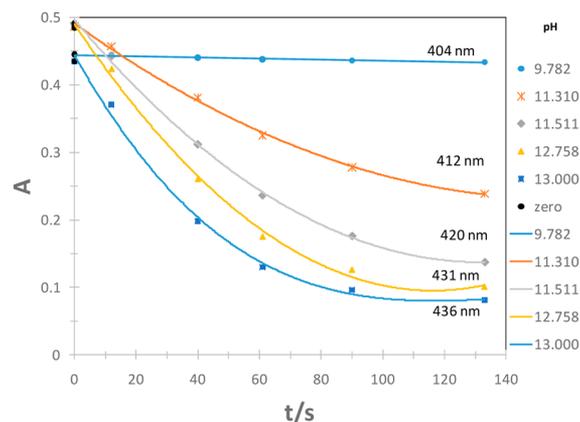


Figure 4. Plots of the absorbance vs time at different pH values for quercetin at 2.46×10^{-5} M. The black dots correspond to time zero obtained by extrapolation.

myricetin (5.8×10^{-5} M), and kaempferol (3.73×10^{-5} M), recorded at different pH values, are shown in Figure 5. The shifts caused by the pH increase were found to be similar in direction and magnitude for the entire studied compound. It seems important to insist on the fact that to avoid instability issues, the measurements were carried out with fresh solutions, at fixed pHs, as described above.

The SQUAD program was fed the data acquired to calculate the global formation constants (β), from which the pK_a values were obtained (see Table 2). For myricetin only three of the possible six constants were found when its stability in basic media was considered.

From the formation constants and the absorption coefficients at each wavelength obtained from SQUAD, it is possible to obtain the calculated spectra. They are compared with those recorded directly for quercetin, morin, myricetin, and kaempferol at each pH in Figure 6. An excellent agreement is observed, which supports the reliability of the constant models.

Thermodynamic pK_a Values. When the ionic strength is not constant during the experiment, the best way to calculate pK_a values is to incorporate the activity coefficients in the pK_a expression; therefore, in Table 3 are reported all the corrected pK_a s shown in Table 2 when the respective ionic strengths are considered. It is important to mention that this correction was done from the calculation of the activity coefficients using the Bates–Guggenheim approximation; see eq 1.3.38 in Koryta et al.⁶⁶ It is important to stress that the required ionic radii were

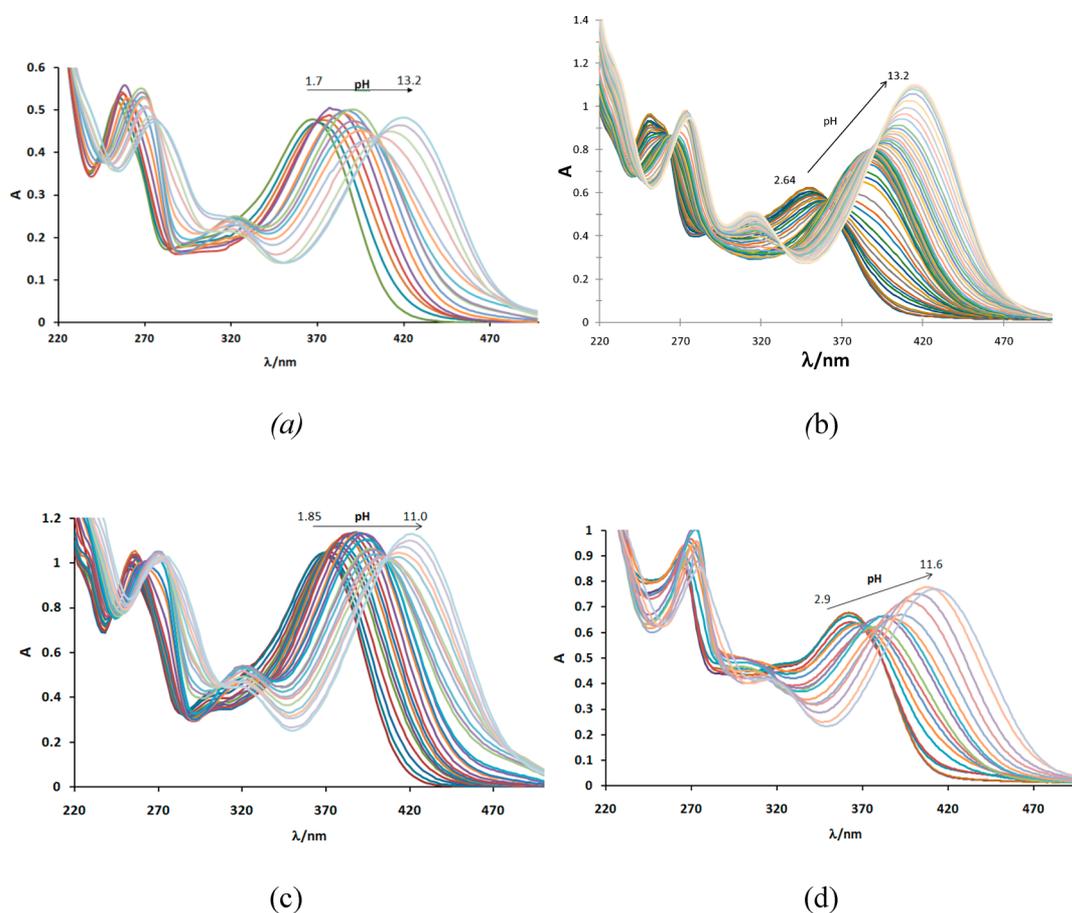


Figure 5. Absorption spectra of quercetin (a), morin (b), myricetin (c), and kaempferol (d) at different pH values.

Table 2. Global Formation Constants (β), pK_a Values, and Their Standard Deviations (σ)

	quercetin			morin			myricetin			kaempferol		
	$\log \beta$	σ	pK_a	$\log \beta$	σ	pK_a	$\log \beta$	σ	pK_a	$\log \beta$	σ	pK_a
HL	13.04	0.05	13.0 ($I = 0.15$)	13.22	0.005	13.22 ($I = 0.15$)				11.63	0.04	11.63 ($I = 0.1$)
H ₂ L	24.50	0.05	11.46 ($I = 0.1$)	24.60	0.01	11.38 ($I = 0.1$)				22.03	0.03	10.40 ($I = 0.09$)
H ₃ L	34.18	0.05	9.68 ($I = 0.09$)	34.12	0.02	9.52 ($I = 0.09$)				30.73	0.03	8.71 ($I = 0.08$)
H ₄ L	41.62	0.05	7.44 ($I = 0.06$)	41.85	0.02	7.73 ($I = 0.06$)	9.65	0.03	9.65 ($I = 0.09$)	37.95	0.04	7.22 ($I = 0.06$)
H ₅ L	47.80	0.06	6.18 ($I = 0.04$)	46.83	0.02	4.98 ($I = 0.03$)	17.22	0.02	7.57 ($I = 0.06$)			
H ₆ L							23.28	0.01	6.33 ($I = 0.04$)			

theoretically calculated as follows: quercetin (0.527 nm), morin (0.521 nm), myricetin (0.499 nm), and kaempferol (0.498 nm).

One useful application of knowing the set of pK_a values for a compound with several acid groups is to construct the distribution diagram. This kind of plot leads to obtaining the molar fraction of the different species at any desired pH (see Figure 7). This becomes particularly relevant for compounds that are present in the human diet or that are consumed as drugs or food supplies. It is predicted that the different forms of quercetin, morin, myricetin, and kaempferol at physiological pH (7.4) are distributed in three species.

The set of constants reported in this work is the most complete, so far, for morin and quercetin. In addition, there are no previously reported values of pK_a s for myricetin. Despite the large number of pK_a values reported for morin, quercetin, and kaempferol, some of them are quite divergent, in particular those that have been identified as corresponding to the first deprotonation. These discrepancies can be explained on the basis of our findings that the first pK_a s are very close (about 1 unit of pK_a). Therefore, we recommend the use of the methodology proposed in this work to address such difficulties.

Theoretical Study on the Deprotonation Mechanisms. Choosing the Methodology. The methodology was chosen after

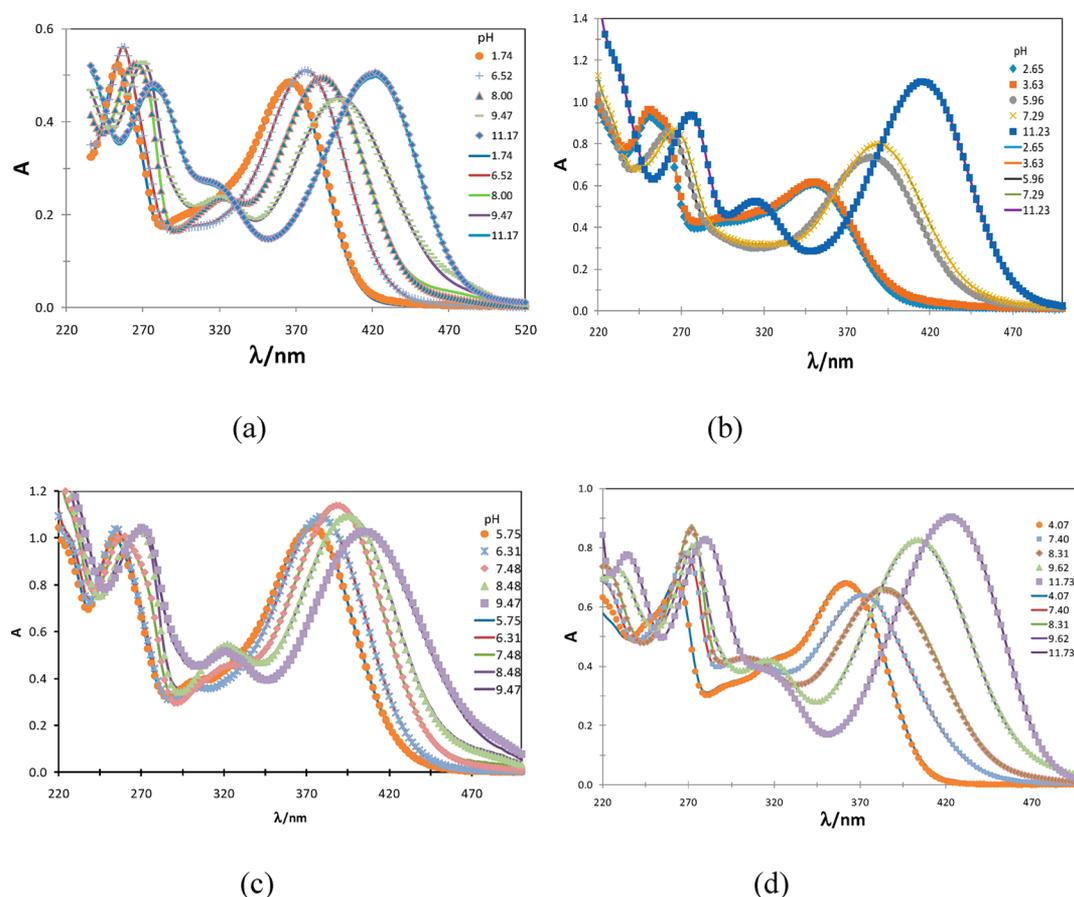


Figure 6. Experimental spectra (dots) and those generated by SQUAD (lines) at different pHs for quercetin (a), morin (b), myricetin (c), and kaempferol (d).

Table 3. Thermodynamic pK_a

	quercetin pK_a	morin pK_a	myricetin pK_a	kaempferol pK_a
HL	12.91	12.94		11.69
H ₂ L	11.53	11.45		10.90
H ₃ L	10.19	10.03		9.12
H ₄ L	7.81	8.11	10.16	7.49
H ₅ L	6.41	5.18	7.94	
H ₆ L			6.56	

testing the performance of different approaches for the calculation of the first pK_a of quercetin. Even though accurate predictions on the pK_a s of flavonols are not in the scope of the computational portion of this work, it is a good criteria to test the reliability of the methodology used for obtaining the Gibbs free energies of reaction associated with the acid–base equilibria



There are some aspects regarding pK_a calculations that are worth mentioning before discussing the results from the different approaches. First of all, estimating accurate pK_a s using computational methodologies remains a very challenging task.⁶⁷ In fact, it is currently accepted that mean absolute deviations smaller than 2 units of pK_a are reasonably accurate.⁶⁷ The main errors seem to arise from modeling solvation. In particular, dielectric continuum models (DCM), which are currently the most widely used for calculating pK_a s in aqueous solution, are frequently not good enough for systems where the short-range solute–solvent interactions are important. One way

to overcome this issue, without making the calculations computationally prohibitive, is to include a few solvent molecules in close proximity to the solute in addition to using a DCM. Aside from using reaction schemes that maximize systematic error cancellations, this has been shown to significantly improve the accuracy of calculated pK_a s.^{62,63,68} The number of possible reaction schemes that can be used to obtain pK_a values is huge.^{62,63,67} The one we are interested in, because of the main goal of the investigation, is known as the direct reaction scheme (A). It has the disadvantage of not conserving the number of charged species on both sides of the equilibrium. Therefore, there is no cancellation of errors when computing energies of reaction, which frequently leads to relatively large errors for phenolic pK_a s, especially when using thermodynamic cycles.⁶² These cycles are based on performing geometry optimizations and frequency calculations in a vacuum, and the solvent effects are included a posteriori using the Gibbs energies of solvation obtained from single point (SP) calculations, usually with the PCM continuum model.

When all of this information is taken into account, we have tested different approaches to assess the importance of the computational strategy on the quality of the results. We have used different basis sets for geometry optimizations and frequency calculations (opt+freq in Table 4) as well as for improving the energy values via single point (SP) calculations. Further, thermodynamic cycles (approaches I to V) in conjunction with the PCM model were also used, which is the most frequently used strategy in this case. In addition, one or five explicit water molecules have been included in the vicinity of the

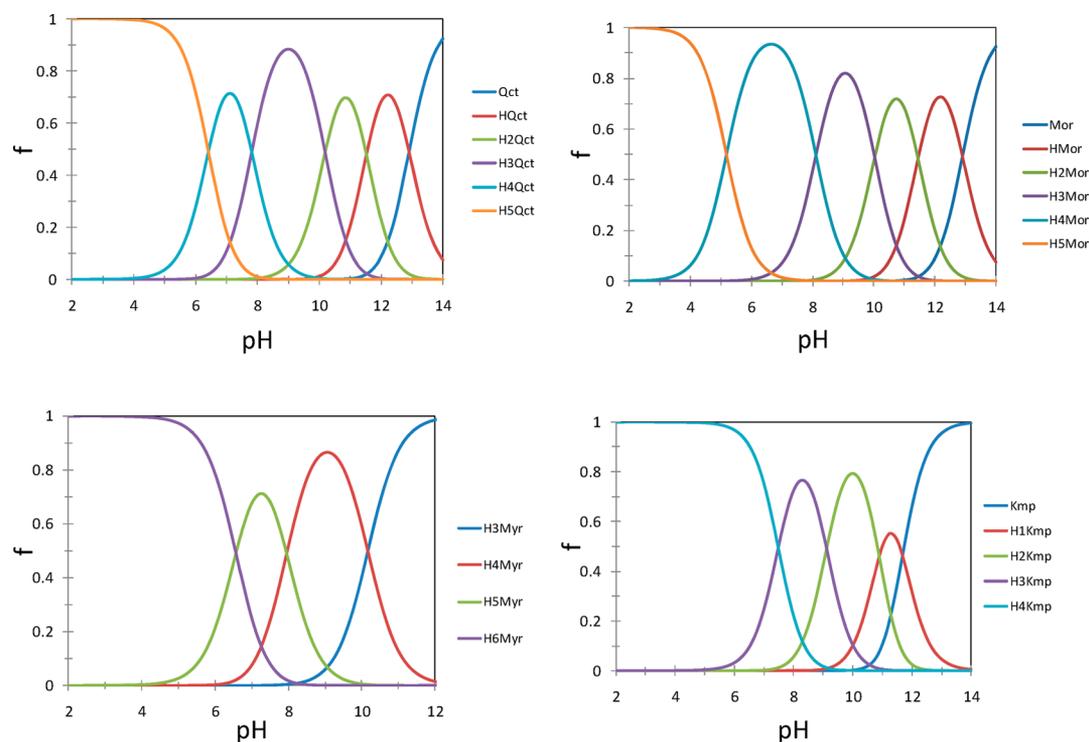


Figure 7. Distribution diagram of species for quercetin, morin, myricetin, and kaempferol constructed from the pK_a values reported in Table 3

Table 4. Different Approaches Tested for the Prediction of the First pK_a of Quercetin

	EWM ^a	opt+freq		energy		solvent effects		error
		basis set	solvent	basis set	method	type		
I	0	6-31G(d)	No	6-31G(d)	PCM	SP	9.00	
II	0	6-31G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	SP	4.06	
III	0	6-31+G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	SP	3.85	
IV	1	6-31+G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	SP	3.50	
V	5	6-31+G(d)	No	6-311++G(d,p)	PCM	SP	4.45	
VI	0	6-31+G(d)	Yes	6-31+G(d)	PCM	all	4.74	
VIa	0	6-31+G(d)	No	6-31+G(d)	PCM	SP	2.94	
VII	0	6-31+G(d)	Yes	6-31+G(d)	SMD	all	0.42	
VIIa	0	6-31+G(d)	No	6-31+G(d)	SMD	SP	2.24	

^aEWM \equiv number of explicit water molecules.

OH groups. Within approach IV, one water molecule is next to the deprotonation site; within approach V, five explicit water molecules were included, one per OH group in quercetin. We also tested “all in solution” strategies with PCM (VI) and SMD (VII) methods for the bulk solvent effects, which means that all the calculations, including geometry optimizations and frequency calculations, were performed in solution. In order to establish the possible importance of performing geometry optimizations in solution, we also report the results arising from PCM and SMD single point calculations using the gas phase geometries (VIa and VIIa) and the same basis sets for approaches VI and VII.

The five possible deprotonation sites were taken into account for this test. The values reported in Table 4 are those corresponding to the deprotonation site leading to the lowest Gibbs free energy of reaction because such a deprotonation path is expected to be the one contributing the most to the first acid–base equilibrium of quercetin. All the approaches used predicted 4a' as the most favorable deprotonation site (i.e., as the one involved in the first quercetin pK_a). This strongly supports the

reliability of theoretical calculations for assessing the deprotonation order for compounds with more than one acid–base equilibrium, which is in fact the main goal of the calculations performed in this work.

Approach I leads to the largest errors because no diffuse functions are included in the basis set (Table 4). Diffuse functions, which have small exponents, improve the description of the wave functions far from the nuclei; therefore, they are crucial to properly describing anions, which have large electron density distributions. Including this kind of functions in the basis set, at least by SP calculations to improve the energy values, reduced the errors significantly with respect to the experiment. It is enough to include diffuse functions for the non-hydrogen atoms because these would be those carrying the negative charge. This is important in the present work because the size of the studied compounds is large, and the calculations are numerous; thus, finding the optimum strategy to warrant reliable results at reasonable computational cost is essential.

The errors arising from using approaches II to VI are intermediate and around 4 pK_a units, regardless of the number of

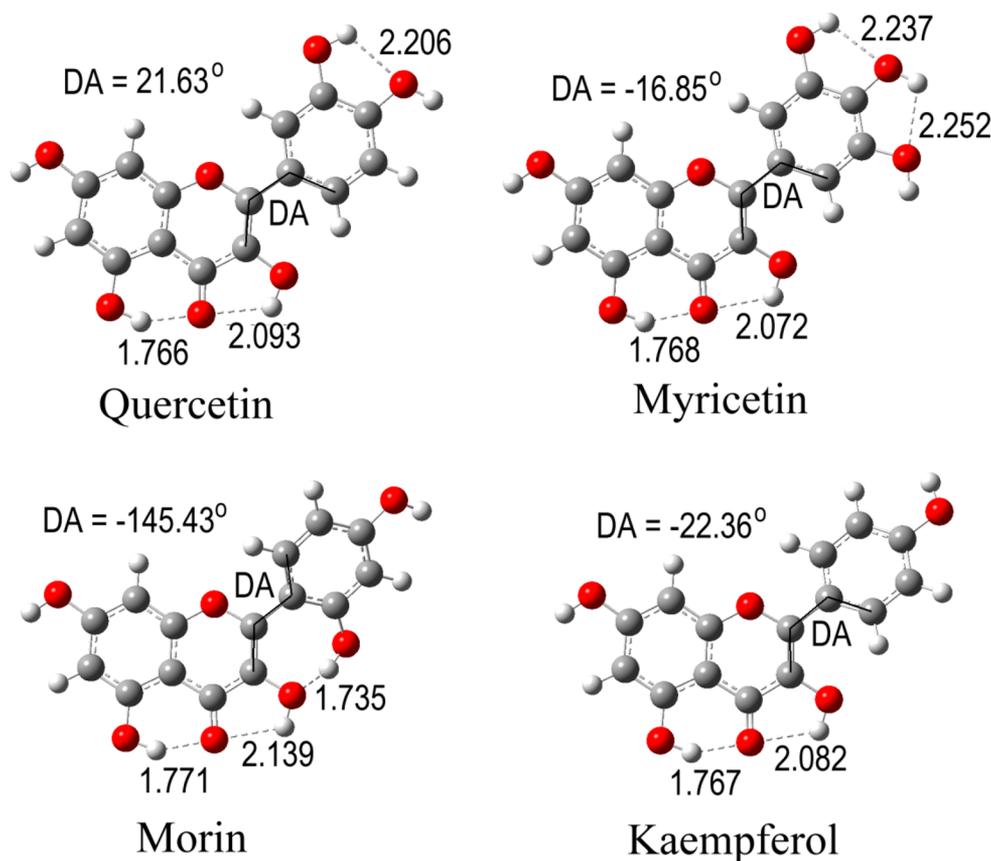


Figure 8. Fully optimized geometries. The distances are reported in Å.

explicit water molecules and of the inclusion of the solvent during geometry optimizations and frequency calculations. It is common to all approaches from II to VI that the bulk solvent effects have been modeled using the PCM method, which does not seem to be good enough for calculating pK_a when the direct scheme is used, in agreement with previous reports.^{62,63,67} However, the pK_a value arising from using the SMD method and the same reaction scheme (i.e., without explicit water molecules) is very close to the experimental value with an error of 0.4 pK_a units, which is significantly below the currently accepted accuracy for pK_a calculations.⁶⁷ In addition, the error of approach VII is lower than that of approach VIIa. This indicates that, at least for polyphenols, performing geometry optimizations with the SMD model may help with improving the quality of the calculated pK_a values when no explicit water molecules are used. On the other hand, geometry optimizations with PCM led to a poorer result than the one obtained with the gas phase geometries.

On the basis of the above detailed analyses, approach VII has been chosen for the calculations of the competing deprotonation pathways for the flavonols studied. It should be noted, however, that the absolute error for pK_a values is expected to increase with the degree of deprotonation (i.e., as the charge of the species involved becomes more negative).

Structures. The conformational searches involving the orientation of the H atom in the OH groups systematically showed that those presenting hydrogen bond interactions (HB) with the O atom in the neighbor OH are lowest in energy. Therefore, they are the ones used in the present work. Regarding the orientation of the B ring, scan calculations varying the dihedral angle 6'-1'-2-3 (DA) were performed to obtain the potential energy surface. The conformations identified as the

global minimum for each compound studied were fully optimized, and their structures are shown in Figure 8, including some relevant geometrical features. These are the structures used for the fully protonated species, from which the consecutive deprotonation steps have been modeled.

All the flavonols studied were found to be planar-like, with deviations from planarity of 21.63°, 16.8°, 34.6°, and 22.4°, for quercetin, myricetin, morin, and kaempferol, respectively. Among the compounds studied, morin is the only one with DA closer to an *s-trans* than to an *s-cis* orientation. This is because it is the only one with an OH group in a site next to 1', which promotes a HB interaction between its H atom and the O in site 3a. This particular interaction was found to be the strongest among all those shown in Figure 8, with a HB distance equal to 1.735 Å. This distinctive structural feature is expected to influence the ease of deprotonation from site 2a' in morin. The HB interaction between the O atom in the carbonyl group and the H in the OH group at site 5a was found to be systematically stronger than that involving the H in the OH group at site 3a for the neutral species. However, this trend might change for the anions. For the above discussion, the relative strength of HB interactions has been based on the HB length.

Deprotonations. The flavonols studied have several phenolic OH groups, which might all be susceptible to deprotonation. Kaempferol has four, quercetin and morin have five, and myricetin has six. They have all been taken into account to assess their deprotonation pathway. The strategy followed to establish the deprotonation order consists of comparing the Gibbs free energies of reaction (ΔG) corresponding to the different competing deprotonation channels. That with the lowest ΔG ,

highlighted in bold letters in Table 5, is identified as the most likely channel and associated with each pK_a .

Table 5. Gibbs Free Energies (ΔG , in kcal/mol) of Reaction for Each Possible Successive Deprotonation in Aqueous Solution at 298.15 K

site	quercetin	myricetin	morin	kaempferol
First Deprotonation				
3a	13.52	13.00	5.48	13.48
5a	15.01	14.89	14.67	15.55
7a	9.94	9.93	9.81	10.11
2a'			5.33	
3a'	11.17	14.59		
4a'	9.00	9.42	12.17	12.15
5a'		12.03		
Second Deprotonation				
3a	16.99	16.00	24.92	15.70
5a	16.86	16.91	19.26	21.31
7a	11.74	11.80	12.04	
3a'	23.40	23.18		
4a'			15.93	13.69
5a'		20.61		
Third Deprotonation				
3a	19.67	17.53	26.79	19.63
5a	22.30	22.25	24.69	22.84
3a'	24.54	24.41		
4a'			17.16	
5a'		21.34		
Fourth Deprotonation				
3a			31.15	
5a	26.86	27.80	26.23	27.31
3a'	26.09	27.37		
5a'		25.09		
Fifth Deprotonation				
3a			28.16	
5a	28.53	28.18		
3a'		31.41		
Sixth Deprotonation				
3a'		32.45		

It is important to note that for the first deprotonation for quercetin and myricetin, the Gibbs free energy value corresponding to the desprotonation of the OH group from position 7a differs no more than 1 kcal/mol from the one

obtained for the deprotonation in group 4a'. The same occurs with morin, between ΔG s found in site 2a' and 3a. This fact indicates that for the first pK_a value, the deprotonation of OH group from both positions can be occurring simultaneously. However, in this work, we will discuss solely the lower energy pathway.

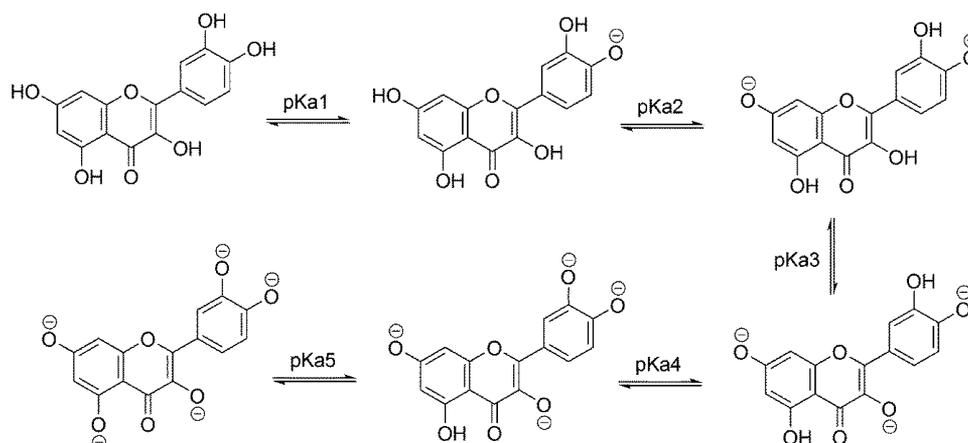
Among the flavonols studied, morin has the peculiarity of presenting a significantly lower first pK_a compared to those of the other three compounds studied. This can be explained on the basis of its structure. The intramolecular HB between the H (2a') and O (3a) weakens the O–H bond, lowering the energy required to remove the proton. This is reflected in the ΔG values associated with the first deprotonation of the compounds studied. Although for quercetin, myricetin, and kaempferol ΔG was found to be 9.00, 9.42, and 10.11 kcal/mol, respectively, for morin this value becomes about 4 kcal/mol lower (5.33 kcal/mol). Therefore, the presence of an OH group at site 2' explains the lower pK_a of morin. Similar behavior is expected for other flavonols with OH groups at this site, or at the 6' site, because such a structural feature is required for the above-mentioned HB interaction.

It was found that for flavonols with at least two OH groups in ring B, the first deprotonation takes place from this ring (Table 4). The only exception to this trend is kaempferol, which has only one OH in ring B. In this case, the first deprotonation involves site 7a. For quercetin, the deprotonation order was found to be 4a', 7a, 3a, 3a', and 5a (scheme 2). For morin and kaempferol, it was found to be 2a', 7a, 4a', 5a, and 3a (scheme 3) and 7a, 4a', 3a, and 5a (scheme 4), respectively.

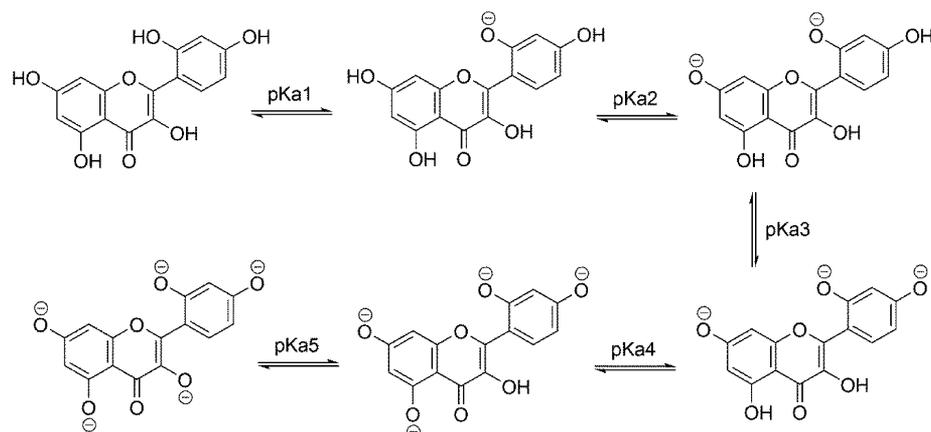
For these three flavonols, each deprotonation is associated with an experimental pK_a value. However, in the case of myricetin, only three pK_a values were detected, although this compound has 6 phenolic OH groups. The ΔG value associated with the sixth deprotonation of myricetin is larger than any of the other calculated ΔG s, but the fifth is similar to those corresponding to quercetin and morin. This indicates that the sixth pK_a of myricetin should be higher than 13.08 (i.e., larger than the largest of the experimentally observed). The deprotonation order for myricetin was found to be 4a', 7a, 3a, 5a', 5a, and 3a' (Scheme 5). Thus, the pK_a s associated with deprotonations from sites 5a' ($pK_{a,4}$), 5a ($pK_{a,5}$), and 3a' ($pK_{a,6}$) are those missing from the experimental data.

In order to provide an estimation of the possible fourth, fifth, and sixth pK_a values for myricetin, a correlation between the

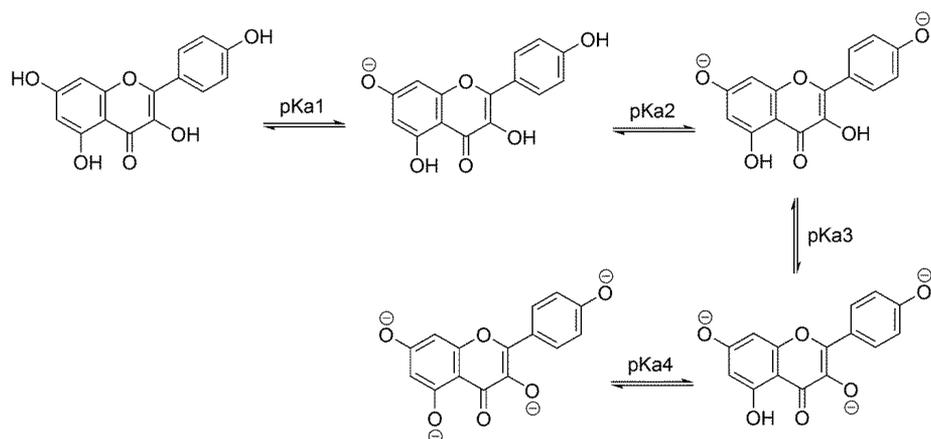
Scheme 2. Deprotonation Pathway for Quercetin



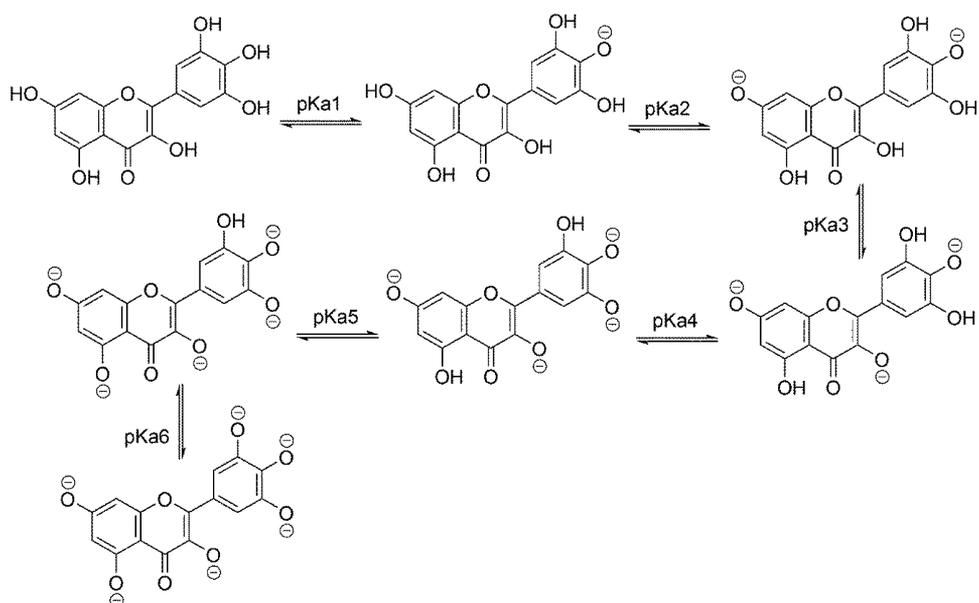
Scheme 3. Deprotonation Pathway for Morin



Scheme 4. Deprotonation Pathway for Kaempferol



Scheme 5. Deprotonation Pathway for Myricetin



experimentally observed pK_a values and the calculated ΔG values has been obtained. The linear correlation is excellent (Figure 9), with $R^2 = 0.95$. Using the expression from the linear fitting the values of $pK_{a,4}$, $pK_{a,5}$, and $pK_{a,6}$ for myricetin are estimated to be 11.84, 12.77, and 14.04, respectively. These values are all larger

than 11, and this compound is not stable enough at $pH \geq 11$. This explains why only its first three pK_a values were experimentally detected. The correlation shown in Figure 9 also supports the reliability of the calculated results and validates its applicability for establishing the deprotonation order of the studied compounds.

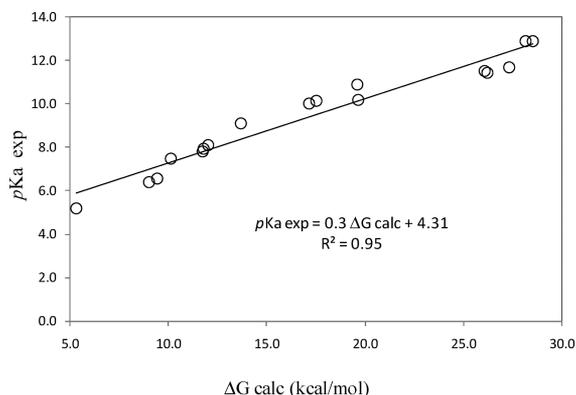


Figure 9. Correlation between the calculated ΔG values (kcal/mol) and all of the experimentally observed thermodynamic pK_a values.

The relative ease of deprotonation among the compounds studied is supported by both experiment and theory. Let us analyze, as examples, the first three deprotonations because they are those that all the compounds studied have in common and because these are the ones for which there are both experimental and theoretical data. For the first deprotonation, the order in pK_a and ΔG values was found to be morin < quercetin < myricetin < kaempferol. For the second deprotonation the ease order is as follows: quercetin < myricetin < morin < kaempferol. For the third deprotonation the order, on the basis of the experimental pK_a values, is morin < myricetin < quercetin < kaempferol. In this particular case, the last two are inverted according to the calculated ΔG values. However, the difference in ΔG is very small (0.04 kcal/mol). Therefore, it is below the accuracy of calculations and it is not possible to make definite distinctions in this case.

CONCLUSIONS

The acidity constant values were determined spectrophotometrically through UV–vis applying SQUAD for the compounds of interest in aqueous solution. For the quercetin and myricetin, which are unstable at basic pH, the use of a method to correct the absorption spectra following the decomposition kinetics of the chemical species is suggested.

The deprotonation order was calculated following the protonic affinities criterion, adding the information obtained from the acidity constants.

From the correlation between the experimentally observed pK_a values and the calculated ΔG values, the values of $pK_{a,4}$, $pK_{a,5}$, and $pK_{a,6}$ for myricetin were obtained.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*M. T. Ramírez-Silva. E-mail: mtrs218@xanum.uam.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CONACyT for the scholarship granted to R.A.D. Also, M.T.R.S. and A.G. gratefully thank the SNI for the distinction of their membership and the stipend received and thank CONACyT for support through project 82932. We gratefully acknowledge the Laboratorio de Visualización y Cómputo Paralelo at Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. The authors are indebted to Professor

Mario Romero-Romo for fruitful discussions regarding this work and to the anonymous reviewers that helped us to improve our work.

REFERENCES

- (1) Perron, N. R.; Brumaghim, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell. Biochem. Biophys.* **2009**, *53*, 75–100.
- (2) Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 75–81.
- (3) Pace-Asciak, C. R.; Hahn, S.; Diamandis, E. P.; Soleas, G.; Goldberg, D. M. The Red Wine Phenolics trans-Resveratrol and Quercetin Block Human Platelet Aggregation and Eicosanoid Synthesis: Implications for Protection Against Coronary Heart Disease. *Clin. Chim. Acta* **1995**, *235*, 207–219.
- (4) Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; et al. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* **1997**, *275*, 218–221.
- (5) Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523–1526.
- (6) Morton, L. W.; Caccetta, R. A. A.; Puddey, I. B.; Croft, K. D. Chemistry and Biological Effects of Dietary Phenolic Compounds: Relevance to Cardiovascular Disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27*, 152–159.
- (7) Corder, R.; Mullen, W.; Khan, N. Q.; Marks, S. C.; Wood, E. G.; Carrier, M. J.; Crozier, A. Oenology: Red Wine Procyanidins and Vascular Health. *Nature* **2006**, *444*, 566.
- (8) Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* **2005**, *16*, 77–84.
- (9) Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T. Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1460–1464.
- (10) Jiang, F.; Dusing, G. J. Natural Phenolic Compounds as Cardiovascular Therapeutics: Potential Role of Their Antiinflammatory Effects. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2003**, *1*, 135–156.
- (11) Sokmen, M.; Serkedjieva, J.; Daferera, D.; Gulluce, M.; Polissiou, M.; Tepe, B.; Akpulat, H. A.; Sahin, F.; Sokmen, A. In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum Acutidens*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3309–3312.
- (12) Stavric, B. Antimutagens and Anticarcinogens in Foods. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 79–90.
- (13) Brown, D. M.; Kelly, G. E.; Husband, A. J. Flavonoid Compounds in Maintenance of Prostate Health and Prevention and Treatment of Cancer. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 253–270.
- (14) Ramassamy, C. Emerging Role of Polyphenolic Compounds in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Review of Their Intracellular Targets. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *545*, 51–64.
- (15) Hamaguchi, T.; Ono, K.; Murase, A.; Yamada, M. Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology Through Different Effects on the Amyloid- β Aggregation Pathway. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 2557–2565.
- (16) Hsu, S. Green Tea and the Skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2005**, *52*, 1049–1059.
- (17) Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. Dietary Phytoestrogens and Health. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995–1016.
- (18) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Rad. Res.* **1995**, *22*, 375–383.
- (19) Cook, N. C.; Samman, S. Flavonoids - Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76.
- (20) Rice-Evans, C.; Miller, N. J. Paganga. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *G. Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.
- (21) Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, *22*, 749–760.

- (22) Kahkonen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3954–3962.
- (23) Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A. E. M.; Rietens, I. M. C. M. The Influence of pH on Antioxidant Properties and the Mechanism of Antioxidant Action of Hydroxyflavones. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *31*, 869–881.
- (24) Materska, M.; Perucka, I. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum Annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1750–1756.
- (25) Fernandez-Pancho, M. S.; Villano, D.; Troncoso, A. M.; Garcia-Parrilla, M. C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From in Vitro Results to in Vivo Evidence. *Crit. Rev. Food Sci.* **2008**, *48*, 649–671.
- (26) Havsteen, B. Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 1141–1148.
- (27) Peres, W. *Radicais Livres em Níveis Biológicos*; Universidade Católica de Pelotas: Rio Grande do Sul, Brazil, 1994.
- (28) Pérez-González, A.; Galano, A. OH Radical Scavenging Activity of Edaravone: Mechanism and Kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306–1314.
- (29) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M. Physicochemical Insights on the Free Radical Scavenging Activity of Sesamol: Importance of the Acid/Base Equilibrium. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13101–13109.
- (30) León-Carmona, J. R.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Galano, A. On the Peroxyl Scavenging Activity of Hydroxycinnamic Acid Derivatives. Mechanisms, Kinetics, and Importance of the Acid/Base Equilibrium. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12534–12543.
- (31) Newton, D. W.; Kluza, R. B. pKa Values of Medicinal Compounds in Pharmacy Practice. *Drug Intell. Clin. Pharm.* **1978**, *12*, 546–554.
- (32) Robert, S. D. Understanding Polyelectrolytes. *Mod. Drug Discovery* **2004**, 41–44.
- (33) Albert, A.; Serjeant, E. P. *Potentiometry and Potentiometric Titrations*; John Wiley and Sons: New York, 1984.
- (34) Albert, A.; Serjeant, E. P. *The Determination of Ionization Constant*; Chapman and Hall: London, 1971.
- (35) Ramírez-Silva, M. T.; Gómez-Hernández, M.; Pacheco-Hernández, M.; de, L.; Rojas-Hernández, A.; Galicia, L. Spectroscopy Study of 5-Amino-1,10-Phenanthroline. *Spectrochim. Acta Part A* **2004**, *60*, 781–789.
- (36) Ishihama, Y.; Oda, Y.; Asakawa, N. Microscale Determination of Dissociation Constants of Multivalent Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1500–1507.
- (37) Rodríguez-Barrientos, D.; Rojas-Hernández, A.; Gutiérrez, A.; Moya-Hernández, R.; Gómez-Balderas, R.; Ramírez-Silva, M. T. Determination of pKa Values of Tenoxicam from ¹H NMR Chemical Shifts and of Oxicams from Electrochromic Mobilities (CZE) with the Aid of Programs SQUAD and HYPNMR. *Talanta* **2009**, *80*, 754–762.
- (38) Sánchez-Rivera, A. E.; Corona-Avendaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Rojas-Hernández, A.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M. A. Spectrophotometric Study on the Stability of Dopamine and the Determination of its Acidity Constants. *Spectrochim. Acta A* **2003**, *59*, 3193–3203.
- (39) Legget, D. J.; McBryde, W. A. E. General Computer Program for the Computation of Stability Constants from Absorbance Data. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1065–1070.
- (40) Legget, D. J. *Computational Methods for Determination of Formation Constants*; Plenum Press: New York, 1985.
- (41) Wang, L.; Tu, Y.-C.; Lian, T.-W.; Hung, J.-T.; Yen, J.-H.; Wu, M.-J. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9798–9804.
- (42) Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.-L. A DFT Study of the Reactivity of OH Groups in Quercetin and Taxifolin Antioxidants: The Specificity of the 3-OH Site. *Food Chem.* **2006**, *97*, 679–688.
- (43) Ghidouche, S.; Es-Safi, N. E.; Ducrot, P. H. Trtmetes Versicolor Laccase Mediated Oxidation of Flavonoids. Influence of the Hydroxylation Pattern of Ring B of Flavonols. *Am. J. Food Technol.* **2007**, *2*, 630–640.
- (44) Qin, C. X.; Chen, X.; Hughes, R. A.; Williams, S. J.; Woodman, O. L. Understanding the Cardioprotective Effects of Flavonols: Discovery of Relaxant Flavonols without Antioxidant Activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1874–1884.
- (45) Xiao, J.; Suzuki, M.; Jiang, X.; Chen, X.; Yamamoto, K.; Ren, F.; Xu, M. Influence of B-Ring Hydroxylation on Interactions of Flavonols with Bovine Serum Albumin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2350–2356.
- (46) Wolfe, K. L.; Liu, R. H. Structure–Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8404–8411.
- (47) Cao, S.; Jiang, X.; Chen, J. Effect of Zinc (II) on the Interactions of Bovine Serum Albumin with Flavonols Bearing Different Number of Hydroxyl Substituent on B-ring. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 146–152.
- (48) Yi, L.; Jin, X.; Chen, C.-Y.; Fu, Y.-J.; Zhang, T.; Chang, H.; Zhou, Y.; Zhu, J.-D.; Zhang, Q.-Y.; Mi, M.-T. Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5471–5489.
- (49) Tyukavkina, N. A.; Pogodaeva, N. N. Ultraviolet Absorption of Flavonoids VIII. Ionization Constants of Kaempferol and Quercetin. *Chem. Nat. Compd.* **1975**, *11*, 741–743.
- (50) Herrero Martínez, J. M.; Sanmartín, M.; Roses, M.; Bosch, E.; Rafols, C. Determination of Dissociation Constants of Flavonoids by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *28*, 1886–1895.
- (51) Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846–4851.
- (52) Herrero-Martínez, J. M.; Repollés, C.; Bosch, E.; Rosés, M.; Ràfols, C. Potentiometric Determination of Aqueous Dissociation Constants of Flavonols Sparingly Soluble in Water. *Talanta* **2008**, *74*, 1008–1013.
- (53) Zenkevich, I. G.; Guschina, S. V. Determination of Dissociation Constants of Species Oxidizable in Aqueous Solution by Air Oxygen on an Example of Quercetin. *J. Anal. Chem.* **2010**, *65*, 371–375.
- (54) Pérez-González, A.; Rebollar-Zepeda, A. M.; León-Carmona, J. R.; Galano, A. Reactivity Indexes and O-H Bond Dissociation Energies of a Large Series of Polyphenols: Implications for their Free Radical Scavenging Activity. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 241–249.
- (55) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- (56) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09*, Revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (57) Liptak, M. D.; Shields, G. C. Accurate pKa Calculations for Carboxylic Acids Using Complete Basis Set and Gaussian-n Models Combined with CPCM Continuum Solvation Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7314–7319.
- (58) Liptak, M. D.; Gross, K. C.; Seybold, P. G.; Feldgus, S.; Shields, G. C. Absolute pKa Determinations for Substituted Phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6421–6427.
- (59) Palascak, M. W.; Shields, G. C. Accurate Experimental Values for the Free Energies of Hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3692–3694.
- (60) Murlowska, K.; Sadlej-Sosnowska, N. Absolute Calculations of Acidity of C-Substituted Tetrazoles in Solution. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5590–5595.
- (61) Brown, T. N.; Mora-Diez, N. Computational Determination of Aqueous pKa Values of Protonated Benzimidazoles (Part 1). *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 9270–9279.
- (62) Rebollar-Zepeda, A. M.; Campos-Hernández, T.; Ramírez-Silva, M. T.; Rojas-Hernández, A.; Galano, A. Searching for Computational Strategies to Accurately Predict pKas of Large Phenolic Derivatives. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2528–2538.

(63) Rebollar-Zepeda, A. M.; Galano, A. First Principles Calculations of pKa Values of Amines in Aqueous Solution: Application to Neurotransmitters. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 3449–3460.

(64) Camaioni, D. M.; Schwerdtfeger, C. A. Comment on “Accurate Experimental Values for the Free Energies of Hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺”. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 10795–10797.

(65) Xu, G.-R.; In, M. Y.; Yuan, Y.; Lee, J.-J.; Kim, S. In situ Spectroelectrochemical Study of Quercetin Oxidation and Complexation with Metal Ions in Acidic Solutions. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 889–892.

(66) Koryta, J.; Dvořák, J.; Kavan, L. *Principles of Electrochemistry*; John Wiley & Sons: Chichester, U. K., 1993.

(67) Ho, J.; Coote, M. L. A Universal Approach for Continuum Solvent pKa Calculations: Are We There Yet? *Theor. Chem. Acc.* **2009**, *125*, 3–21.

(68) Ho, J.; Coote, M. L. pKa Calculation of Some Biologically Important Carbon Acids - An Assessment of Contemporary Theoretical Procedures. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 295–306.