



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
UNIDAD IZTAPALAPA

**“ESTUDIO TEÓRICO Y EXPERIMENTAL DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE ALGUNOS DERIVADOS DEL ÁCIDO  
HIDROXICINÁMICO”**

Tesis que presenta  
**Alma Karina Rivas Sánchez**  
Para obtener el grado de  
**Maestría en Ciencias (Química)**

Asesoras:

Dra. María Teresa Ramírez Silva

Dra. Annia Galano Jiménez

Jurado calificador:

Presidente: Dr. Alberto Rojas Hernández

Secretario: Dr. Joel Ireta Moreno

Vocal: Dra. Patricia Balderas Hernández

México, DF. Junio 2014

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
RESUMEN .....	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Introducción .....	3
1.2 DAHC .....	4
1.2.1 Ácido t-cinámico .....	4
1.2.2 Ácidos cumáricos .....	5
1.2.1 Ácido cafeico .....	5
1.3 Constantes de acidez .....	6
1.3.1 Constantes de acidez de ácidos polipróticos .....	7
1.4 Antioxidantes .....	7
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS .....	10
2.1 Objetivos .....	10
2.1.1 Objetivo general .....	10
2.1.2 Objetivos particulares .....	10
CAPÍTULO 3. MARCO TEÓRICO .....	12
3.1 Marco Teórico .....	12
3.1.1 Espectroscopía de absorción .....	12
3.1.2 Leyes de absorción de la radiación .....	12
3.1.3 Absorbancia en espectrofotometría .....	13
3.1.4 Métodos de determinación de la capacidad antioxidante .....	13
3.1.4.1 Método de DPPH.....	15
3.1.4.1 Método de biosensores amperométricos .....	16
3.1.6 Teoría de los funcionales de la densidad .....	17
CAPÍTULO 4. EXPERIMENTACIÓN.....	19
4.1 Desarrollo experimental .....	19
4.1.1 Reactivos .....	19
4.1.2 Equipo .....	19
4.2.3 Metodología .....	19
4.2.3.1 Computacional.....	19

4.2.3.2 Experimental .....	20
CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5.1 Ácido t-cinámico .....	24
5.1.1 Estabilidad.....	24
5.1.2 Espectros de absorción UV-Vis.....	24
5.1.3 Constante de acidez .....	25
5.2 Ácido <i>p</i> -cumárico .....	27
5.2.1 Estabilidad.....	27
5.2.2 Espectros de absorción experimentales .....	28
5.2.3 Cálculo del valor de <i>pK</i> <sub>a</sub> experimental.....	28
5.3 Ácido <i>o</i> -cumárico .....	30
5.3.1 Estabilidad.....	30
5.3.2 Espectros de absorción experimentales .....	30
5.3.3 Cálculo del valor de <i>pK</i> <sub>a</sub> experimental.....	31
5.4 Ácido <i>m</i> -cumárico .....	33
5.4.1 Estabilidad.....	33
5.4.2 Espectros de absorción experimentales .....	33
5.4.3 Cálculo de los valores de <i>pK</i> <sub>a</sub> experimentales.....	34
5.5 Ácido cafeico .....	36
5.5.1 Cálculo de los valores de <i>pK</i> <sub>a</sub> experimentales.....	36
5.6 Determinación de la capacidad antioxidante .....	37
5.6.1 Ensayo con DPPH.....	37
5.6.2 Determinación amperométrica con biosensores.....	39
5.6.2.1 Lacasa.....	40
5.6.2.2 Tirosinasa .....	42
5.7 Estudio teórico .....	46
5.7.1 Orden de desprotonación.....	46
5.7.2 Espectros de absorción UV-Vis.....	47
5.7.3 Cálculo de valores de <i>pK</i> <sub>a</sub> .....	50
5.7.4 Estudio termodinámico.....	52
5.7.5 Estudio cinético .....	53
5.7.6 Valor relativo a Trolox .....	54

CAPITULO 6. CONCLUSIONES.....	57
CAPÍTULO 7. ANEXOS.....	59
8. REFERENCIAS.....	68



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00049  
Matrícula: 2121800531

ESTUDIO TEORICO Y  
EXPERIMENTAL DE LA CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE DE ALGUNOS  
DERIVADOS DEL ACIDO  
HIDROXICINAMICO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 6 del mes de junio del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ  
DRA. PATRICIA BALDERAS HERNANDEZ  
DR. JOEL IRETA MORENO

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

MAESTRA EN CIENCIAS (QUIMICA)  
DE: ALMA KARINA RIVAS SANCHEZ

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

Aprobar

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

VOCAL

DRA. PATRICIA BALDERAS HERNANDEZ

SECRETARIO

DR. JOEL IRETA MORENO

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la doctora María Teresa por haber confiado en mí para realizar este proyecto, por sus enseñanzas, comentarios y sugerencias.

Un agradecimiento especial a la doctora Annia por la disposición y la paciencia para ayudarme en todo momento encontrando la forma de explicarme de manera clara mis dudas y siempre con una sonrisa.

A mis sinodales la Dra. Patricia, el Dr. Alberto Rojas y al Dr. Joel Ireta por haberse tomado el tiempo para revisar este escrito, por sus comentarios y sugerencias.

Gracias a los compañeros de área de química analítica a Jorge por enseñarme algunas técnicas experimentales a pesar de tener otras ocupaciones, a Adriana por tu apoyo y paciencia al inicio de mi aprendizaje en la parte teórica, a Brisa por tus sugerencias y comentarios y sobre todo por tu amistad.

A ti mamá porque gracias a tu apoyo y ejemplo he llegado a cumplir una de mis metas, por darme la herencia más valiosa que pudiera recibir.

A mis hermanos Raúl, Geymy y Juan porque cada uno a su manera me ha enseñado cosas muy importantes que en ninguna institución podría aprender.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de este proyecto.

A CONACYT por el apoyo financiero otorgado a través de la beca para estudios de Maestría, con número de becario 269183.

## TABLA DE ABREVIATURAS

EO	Estrés oxidativo
RL	Radicales libres
DAHC	Derivados del ácido hidroxicinámico
LDL	Lipoproteína de baja densidad
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picil hidrazilo
SQUAD	Coeficientes de estabilidad para datos de absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ABTS	Catión radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
HT	Transferencia de hidrógeno
SET	Transferencia de electrones
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
IUPAC	Unión internacional de química aplicada y pura
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad
RAF	Formación del aducto radicalico
QM-ORSA	Evaluación basada en la química cuántica para la capacidad captadora de radicales libres

**RESUMEN**

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar la capacidad antioxidante de los derivados del ácido hidroxicinámico, los que se estudiaron en este trabajo fueron el ácido t-cinámico, el ácido *p*-cumárico (y sus isómeros *meta*- y *orto*-) y el ácido cafeíco.

Se utilizaron dos metodologías experimentales para la determinación de la capacidad antioxidante utilizando Trolox como antioxidante; el ensayo con DPPH y el uso de biosensores amperométricos con Lacasa y Tirosinasa.

Una tercer metodología teórica fue utilizada para calcular las constantes de velocidad en dos medios (acuoso y lipídico) con tres mecanismos de reacción, el de transferencia de hidrogeno, transferencia de electrones y la formación de aducto radicalico. Con el cálculo de estas constantes se obtuvo el valor relativo a Trolox que permitió la comparación con los valores de TEAC experimentales.

Los resultados muestran en las tres metodologías que el ácido cafeíco es un eficiente antioxidante primario, y que la posición del OH e el anillo aromático en el caso de los ácidos cumáricos afecta la reactividad, y esto se ve reflejado en la capacidad para atrapar radicales libres, el ácido t-cinámico no es un buen antioxidante dado que solo posee un OH del ácido carboxílico.



# **CAPÍTULO 1.**

# **INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción

Los compuestos con capacidad antioxidante son cada vez de mayor interés debido a su importante papel en el control del estrés oxidativo (EO). El EO es un estrés químico causado por el desbalance entre la producción y el consumo de radicales libres (RL). Desde el punto de vista químico los RL son especies con al menos un electrón desapareado lo que los hace particularmente reactivos. Diversos estudios han mostrado que los RL contribuyen al desarrollo de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras asociadas con el sistema inmune [1]. El daño en los sistemas biológicos puede ser acumulativo cuando la concentración de RL y antioxidantes no están en equilibrio [2].

Un antioxidante se refiere a una sustancia que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasa significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas del ácido desoxirribonucleico (ADN) [3].

Los antioxidantes son capaces de neutralizar o atrapar los radicales libres por medio de la transferencia de hidrógeno, la transferencia de electrón, o la formación de aductos. Por lo tanto son vitales para la salud [4]. Entre los compuestos que han mostrado tener una alta capacidad antioxidante se encuentran las especies que en su estructura tienen un OH unido al anillo aromático.

En este grupo se encuentran los ácidos fenólicos tales como los ácidos hidroxicinámicos ( $C_9H_8O_2$ ) que han sido de mucho interés en los últimos años debido a los beneficios potenciales para la salud. Estos ácidos han demostrado que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, anticancerígenas así como anti-inflamatorias, vasodilatadoras y antioxidantes [5-7].

Los derivados del ácido hidroxicinámico (DAHC) constituyen un subgrupo importante de compuestos fenólicos [8,9]. Están ampliamente distribuidos en cereales, frutas, hierbas,

verduras y otras plantas comestibles [10,11]. Los más comunes son los ácidos cafeico, *p*-cumárico [12-14].

Debido a que estos compuestos presentan equilibrios ácido-base su forma dominante puede ser neutra o aniónica dependiendo del *pH* del medio. La actividad antioxidante de las diferentes formas puede ser diferente. De hecho se ha propuesto que la presencia del anión fenóxido incrementa la actividad antioxidante de este tipo de compuestos [15]. Es por ello que es de suma importancia conocer tanto sus valores de *pKa* como su orden de desprotonación.

## 1.2 DAHC

Los DAHC son metabolitos fenólicos secundarios bien conocidos que se encuentran en las plantas y que presentan alta capacidad antioxidante [16], además protegen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y presentan efectos neuroprotectores y actividad antialérgica [17].

Entre los DAHC se encuentran el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico [18]. En este trabajo se estudian el ácido cafeico ( $C_9H_8O_4$ ), el ácido *p*-cumárico ( $C_9H_8O_3$ ) y sus isómeros (los ácidos *o*-cumárico y *m*-cumárico), así como el ácido *t*-cinámico ( $C_9H_8O_2$ ) para investigar la importancia del efecto de la posición del OH fenólico sobre la actividad antioxidante.

### 1.2.1 Ácido *t*-cinámico

El ácido 3-fenil 2-propenoico (HCnm) (Figura 1), también conocido como ácido cinámico y sus derivados están ampliamente distribuidos en varias frutas, vegetales y flores, tienen propiedades farmacológicas tales como antioxidantes, muestran actividad antimicrobiana y es un agente antidiabético [19-21].

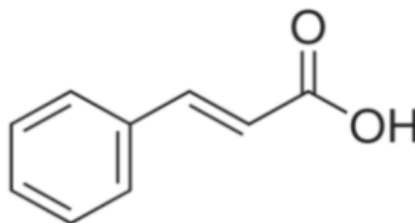


Figura 1. Estructura química del ácido *t*-cinámico

### 1.2.2 Ácidos cumáricos

Los ácidos cumáricos son compuestos DAHC. El ácido cumárico presenta tres isómeros: los ácidos *p*-cumárico  $H_2(p-Cmc)$ , ácido *m*-cumárico  $H_2(m-Cmc)$ , y *o*-cumárico  $H_2(o-Cmc)$ , que difieren por la sustitución del grupo hidroxil en el grupo fenil como se muestra en la Figura 2.

Los ácidos cumáricos exhiben propiedades antioxidantes y también muestran una gran variedad de propiedades farmacológicas, anticancerígenas y antimutagénicas [22]. Estos ácidos funcionan como agentes quimiprotectores, agentes nitrosantes en varios compartimentos biológicos, incluyendo fluidos salivales y gástricos [23].

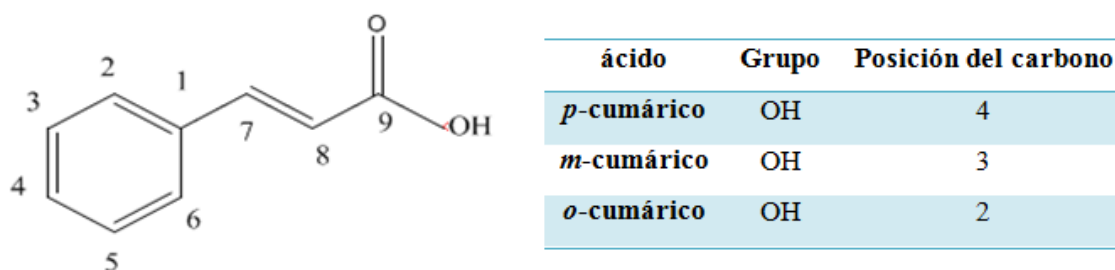


Figura 2. Ácidos cumáricos según el sitio de sustitución: *p*-cumárico, *m*-cumárico y *o*-cumárico.

### 1.2.1 Ácido cafeico

El ácido cafeico,  $H_3Cf$  (ácido 3, 4-dihidroxicinámico), es uno de los compuestos fenólicos naturales ampliamente distribuido en plantas, vegetales, frutas, café y té [24]. Este ácido posee propiedades antioxidantes ya que neutraliza diferentes especies reactivas, incluyendo el radical libre DPPH [25], los radicales peroxilo [26] e hidroxilo [27], el anión superóxido, peroxinitrito y compuestos mutagénicos tales como nitrosaminas [28]. Estudios farmacológicos muestran que ejerce efectos protectores sobre la neurodegeneración inducida por glutamato en neuronas corticales primarias cultivadas [29].

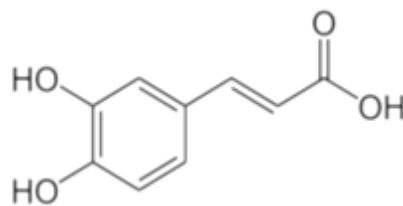


Figura 3. Estructura química del ácido cafeico

### 1.3 Constantes de acidez

Hay una gran cantidad de sustancias que se comportan como ácidos o bases de Bronsted en solución acuosa. Los equilibrios de transferencia de protones son muy importantes para una gran variedad de compuestos químicos de importancia biológica, que con frecuencia son ácidos o bases débiles [30]. Las constantes de disociación ácida ( $K_a$ ) no solo caracterizan la acidez de esos compuestos sino también tienen influencia en su reactividad. Estas constantes son comúnmente reportadas como  $pK_a$  y sus valores están relacionados con numerosas propiedades tales como solubilidad y velocidad de absorción [31]. Por lo tanto el conocimiento de los valores de  $pK_a$  es de vital importancia para el entendimiento del comportamiento de estas sustancias bajo diferentes condiciones.

El valor de  $pK_a$  es la medida más común de acidez termodinámica, y se define por la siguiente ecuación:

$$pK_a = -\log(K_a) \quad (1)$$

Donde  $K_a$  es la constante de equilibrio para la desprotonación del ácido [32].

Varios métodos han sido utilizados para la determinación de constantes de acidez incluyendo valoración potenciométrica, espectrofotometría y electroforesis capilar. Los métodos espectroscópicos son sensibles y apropiados para la determinación de la constante de acidez especialmente cuando todos los componentes que participan en el equilibrio químico tienen espectros distintos.

Sin embargo, la determinación espectrofotométrica directa de las constantes de acidez en un sistema en el que algunos de los componentes tienen espectro similar es difícil, si no imposible [33]. Por lo tanto, para superar este problema los métodos gráficos y computacionales se pueden utilizar. En este trabajo se hace uso del programa

computacional SQUAD [34] (Anexo A) utilizado para el refinamiento de las constantes de acidez y el paquete computacional Gaussian 09 [35] para los cálculos de estructura electrónica.

### 1.3.1 Constantes de acidez de ácidos polipróticos

Los ácidos polipróticos son sistemas de fórmula general  $H_nA$  que se disocian de acuerdo a equilibrios sucesivos, y cada uno presenta su constante de equilibrio como se muestra en las ecuaciones 2, 3 y 4.



Las constantes de disociación son diferentes para cada fase ( $K_{a1}, K_{a2}, \dots, K_{an}$ ). Cada protón sucesivo se libera con mayor dificultad que el anterior, ya que queda más fuertemente atraído por el anión formado [36].

Los cálculos de las constantes de equilibrio para ácidos polipróticos son complejos porque las concentraciones de las distintas especies presentes están determinadas por los equilibrios sucesivos. La resolución requiere hacer aproximaciones. El programa computacional SQUAD realiza el cálculo de las concentraciones de cada especie formada por medio del método numérico de Gauss-Newton.

El significado de estas constantes es análogo al que tiene  $K_a$  en ácidos monopróticos, los valores de  $pK_a$  demarcan zonas de existencia predominante de cada una de las especies originadas a partir del ácido no disociado.

### 1.4 Antioxidantes

Los antioxidantes retrasan significativamente la oxidación de un sustrato oxidable. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN [3].

Los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:

1. Disminuyendo la concentración de oxidantes.
2. Evitando la iniciación de la reacción en cadena al “barrer” (atrapar o detener una reactividad química muy alta), los primeros RL que se forman.
3. Uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
4. Transformando los peróxidos en productos menos reactivos.

Entre estos antioxidantes se incluyen proteínas como las enzimas derivadas del sistema citocromo-oxidasa, las superóxido dismutasas, las catalasas y peroxidasas como la glutatión-peroxidasa y la glutatión-reductasa. Así como sistemas no proteicos, como las vitaminas A, C, E, ácido úrico, aminoácidos como, glicina y taurina, y el tripéptido glutatión, compuestos fenólicos, como ácido gálico, ferúlico, cafeico y ácidos cumáricos a los que se denominan atrapadores (scavengers) de RL.

En general los RL son electrófilos (que aceptan electrones), causando la producción de otro RL menos reactivo y todavía inestable que reacciona con otra molécula para producir otro RL.

Los atrapadores pueden definirse como aquellas sustancias que donan electrones a otras especies, reduciéndolas y haciéndolas menos reactivas [37, 38].

# **CAPÍTULO 2.**

## **OBJETIVOS**



## CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos

#### 2.1.1 Objetivo general

Determinar las constantes de acidez y la capacidad antioxidante de algunos DAHC

#### 2.1.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar espectroscópicamente (UV-Vis) las constantes de acidez de los DAHC en medio acuoso.
- 2.- Estudiar los espectros de absorción teóricos UV-Vis de los DAHC para identificar las transiciones involucradas en las diferentes bandas.
- 3.- Determinar el orden de desprotonación de los DAHC mediante teoría de los funcionales de la densidad.
- 4.- Determinar experimentalmente la capacidad antioxidante de los ácidos; *t*-cinámico, *p*-cumárico y cafeico mediante su reacción con DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo).
- 5.- Determinar teóricamente la capacidad antioxidante de los compuestos DAHC con el radical  $\text{HOO}^\bullet$ , en base a consideraciones termodinámicas y cinéticas.
- 6.- Comprender la importancia de los mecanismos de reacción, la influencia del medio (polaridad y *pH*) y la actividad relativa de las formas neutras y aniónicas de los diferentes compuestos.

# **CAPÍTULO 3.**

# **MARCO TEÓRICO**

## CAPÍTULO 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Marco Teórico

#### 3.1.1 Espectroscopía de absorción

La Espectrofotometría de absorción en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético es una técnica instrumental de amplio uso. Se basa en la absorción de radiación ultravioleta y visible por el analito, como consecuencia se produce un espectro de absorción que proporciona información fundamental para la determinación de la composición química, la estructura y propiedades de la materia [39].

El proceso de absorción de las radiaciones ultravioleta y visible provoca la excitación de electrones a niveles de energía superiores.

#### 3.1.2 Leyes de absorción de la radiación

Cuando un haz de radiación monocromática atraviesa un sistema de una especie absorbente, la intensidad del haz incidente  $I_0$  se atenúa disminuyendo hasta  $I$ .

La fracción de radiación incidente que consigue atravesar la muestra se define como Transmitancia y está dada por la siguiente relación:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (5)$$

Un parámetro de mayor utilidad es la absorbancia que es definida como:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (6)$$

Según la ley de Beer, la absorbancia  $A$  es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente  $C$  y a la longitud de paso óptico  $l$  del medio de absorción

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C \quad (7)$$

Donde

$I_0$ : Intensidad de la luz incidente

$I$  : Intensidad de la luz transmitida a través de la muestra

$\varepsilon$ : Coeficiente de absorptividad

### 3.1.3 Absorbancia en espectrofotometría

La forma común de la espectrofotometría requiere de la combinación de la ley de Beer y de las leyes de aditividad (ecuación 9) para la absorbancia por la existencia de especies químicas. Así que la absorbancia del sistema, dada una longitud de onda, y una longitud de paso óptico, está descrita por la siguiente ecuación [40]:

$$A^{(\lambda)} = A_L^{(\lambda)} + A_{HL}^{(\lambda)} + \dots + A_{jL}^{(\lambda)} + \dots + A_{H_nL}^{(\lambda)} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} &= \varepsilon_L^{(\lambda)} l [L^{Z_L}] + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} l [HL^{(Z_{L+1})}] + \dots + \varepsilon_{H_jL}^{(\lambda)} l [H_jL^{(Z_{L+j})}] + \dots + \varepsilon_{H_nL}^{(\lambda)} l [H_nL^{(Z_{L+n})}] \\ &= \varepsilon_L^{(\lambda)} f_L [L'] + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} f_{HL} [L'] + \dots + \varepsilon_{H_jL}^{(\lambda)} f_{H_jL} [L'] + \dots + \varepsilon_{H_nL}^{(\lambda)} f_{H_nL} [L'] \quad (9) \\ &= (\varepsilon_L^{(\lambda)} f_L + \varepsilon_{HL}^{(\lambda)} f_{HL} + \dots + \varepsilon_{H_jL}^{(\lambda)} f_{H_jL} + \dots + \varepsilon_{H_nL}^{(\lambda)} f_{H_nL}) l [L'] = \varepsilon_L l [L'] \end{aligned}$$

Donde  $[L']$  representa la suma de las concentraciones de las especies de los componentes  $L$  en el sistema.

Esta ecuación demuestra que la absorbancia o el coeficiente de absorptividad molar pueden estar escritos en función de las fracciones molares de todas las especies en el sistema.

Puesto que, a partir de las absorbancias se pueden obtener las concentraciones de las especies, entonces se puede establecer una relación entre las fracciones y las concentraciones de dichas especies y así obtener el valor de  $pK_a$  como función de las absorbancias.

### 3.1.4 Métodos de determinación de la capacidad antioxidante

En la actualidad no existe un método universal para medir la capacidad antioxidante, en parte debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de las matrices que necesitan ser evaluadas.

En general, existen varias aproximaciones para la clasificación de métodos para medir la actividad antioxidante. Una de ellas se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos [41], mientras que otra los clasifica de acuerdo con el mecanismo mediante el cual sucede el proceso antioxidante.

En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, de hecho, se han usado algunos RL metaestables, coloreados, con fuerte absorción en el espectro visible, para determinar actividad estabilizadora de RL.

Los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros, los lípidos constituyen el sistema más frecuente debido a la importancia de su oxidación en el desarrollo de enfermedades: así como el deterioro de la calidad de los alimentos.

Existe otra clasificación que describe los métodos para medir la capacidad antioxidante según sea su mecanismo de reacción, pues se conoce que los antioxidantes pueden estabilizar RL siguiendo al menos dos mecanismos, el de transferencia de átomos de hidrógeno (por sus siglas en inglés HT) y el mecanismo de transferencia de electrones (por sus siglas en inglés SET). Estos pueden ocurrir de forma paralela y ambos dan como resultado la estabilización del radical libre. Sin embargo el mecanismo que predomine para cada sistema será determinado por la estructura química del antioxidante, su solubilidad, coeficiente de partición, energía de disociación del enlace, potencial de disociación y condiciones del medio de reacción como el  $pH$ . Los métodos más comunes para determinar capacidad antioxidante se corresponden principalmente a procesos HT o SET.

Como se muestra en la siguiente ecuación, un sustrato oxidable ( $LH$ ) es atacado por un radical libre ( $X^{\cdot}$ ) generando una especie no radicalaria y un nuevo radical libre ( $L^{\cdot}$ ).



La reactividad relativa de un antioxidante en un método SET, se basa, fundamentalmente, en la desprotonación y es dominada por el potencial de ionización (PI) [42].

Algunos métodos ampliamente usados como el ABTS (catión radical del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y el DPPH se fundamentan en la estabilización de RL sintéticos metaestables, vía SET, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. Sin embargo, se ha mostrado que estos radicales pueden estar estabilizados por diferentes mecanismos [43].

#### 3.1.4.1 Método de DPPH

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand-Williams [44] y utiliza el radical DPPH como radical libre.

El DPPH (Figura 4) es uno de los pocos radicales orgánicos estables, presenta una fuerte coloración violeta, es comercialmente disponible y no tiene que ser generado en situ. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad antioxidante para estabilizar el radical DPPH. Esta medición se realiza espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a una longitud de onda de 514 nm [45]. La reacción de estabilización se considera que transcurre principalmente mediante un mecanismo SET, y un pequeño aporte de HT [46]. Esta hipótesis se basa en el alto impedimento estérico que presenta el DPPH en su centro radicalico. Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental.

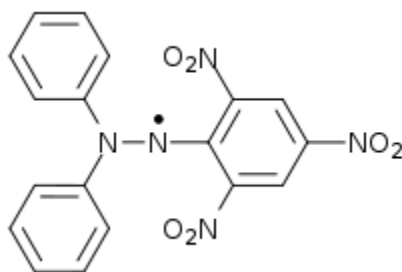


Figura 4. Estructura química del radical libre metaestable DPPH

Aunque existen varias formas de expresar los resultados, una de las más comunes es el índice TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox) en el cual la capacidad antioxidante de una sustancia dada es comparada a la del compuesto estándar Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8 tetrametil croman-2-carboxílico,  $C_{14}H_{18}O_4$ ) un análogo hidrosoluble de la vitamina E.

La reacción del radical DPPH es un método popular para evaluar la fuerza de un antioxidante. Se han investigado aspectos cinéticos de esta reacción con el análogo hidrosoluble de la vitamina E comúnmente usado como estándar.

El DPPH comienza como un radical libre (Figura 5), el paso inicial de la reacción con Trolox permite la formación de una forma oxidada de Trolox ( $\text{TrO}^\bullet$ ) [47].

El radical  $\text{TrO}^\bullet$  reacciona con otra molécula de DPPH (línea b) estabilizando a este radical y formándose un producto de oxidación Trolox [48].

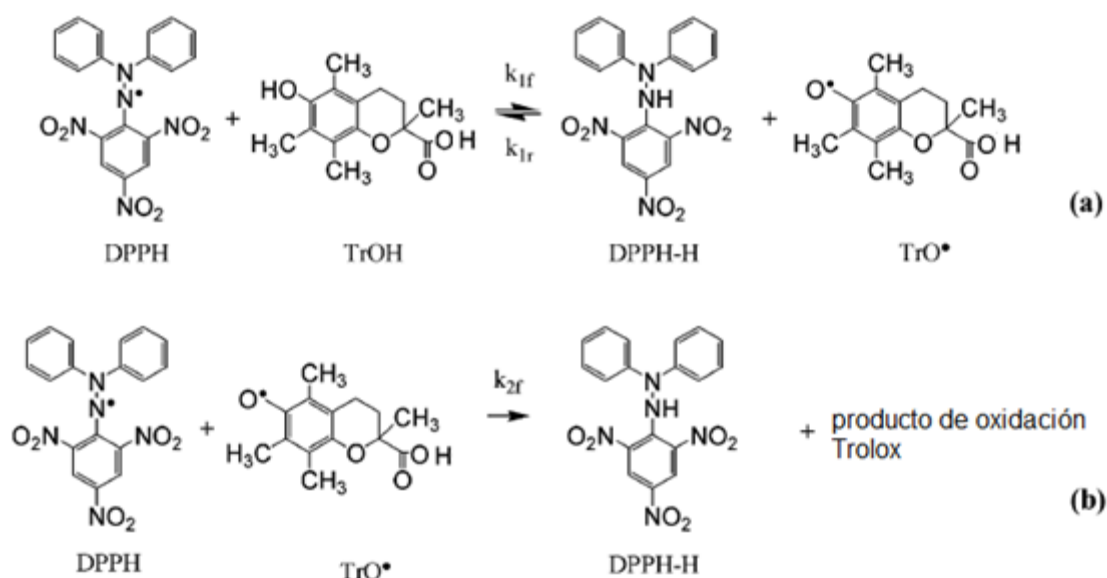


Figura 5. Esquema de reacción propuesto entre el radical DPPH y Trolox [49]

#### 3.1.4.1 Método de biosensores amperométricos

La aparición durante la segunda mitad del siglo XX del primer biosensor, capaz de medir la presión de oxígeno en sangre [50], se considera fruto de la búsqueda de herramientas analíticas rápidas, sensibles y precisas, capaces de simplificar los procesos analíticos y la instrumentación de elevado costo que a menudo se requiere para la detección de analitos de interés. A partir de este momento, se inició el desarrollo de numerosos biosensores con el objetivo de detectar, cuantificar y monitorear ciertos analitos.

La unión internacional de química aplicada y pura (IUPAC) define biosensor como un dispositivo autónomo, integrado, capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa, gracias a un elemento de reconocimiento (receptor biológico) que se encuentra en contacto directo con el sistema de transducción [51]. Por tanto el elemento de reconocimiento biológico debe estar en contacto íntimo con un transductor, que permite procesar la señal producida por el biomaterial y el analito. La señal obtenida se relaciona con la concentración del analito.

Los biosensores amperométricos son los más utilizados. En este caso se trabaja a un potencial fijo respecto al electrodo de referencia. Se mide el flujo de corriente que se genera en la superficie del electrodo de trabajo cuando tiene lugar la oxidación o reducción de alguna de las especies implicadas en la reacción enzimática, y la señal dada se puede correlacionar con la concentración del sustrato. En estos electrodos bien el sustrato o bien el producto deben ser especies electroattractivas y la velocidad de la reacción enzimática se controla por el registro directo de la corriente (transferencia de electrones) producida [52].

### 3.1.6 Teoría de los funcionales de la densidad

La Química Computacional ha demostrado ser una poderosa herramienta para el estudio de las reacciones químicas relacionadas con el estrés oxidativo. Si bien existen numerosas metodologías disponibles, los métodos que han probado ser la mejor opción son los desarrollados en el marco de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT). Esto se debe al excelente compromiso calidad-tiempo de cómputo que los caracterizan.

Ha sido empleada para elucidar el mecanismo antioxidante [53], para identificar el sitio más probable de daño oxidativo [54] para estudiar la acción antioxidante relativa de los carotenoides ante diferentes RL [55, 56], entre otros.

El funcional empleado en el desarrollo de este trabajo tanto para los cálculos termodinámicos como cinéticos es el M05-2X [57]. El funcional M05-2X es un funcional, con un 56% de intercambio no local (2X) que fue parametrizado principalmente para no metales.



# **CAPÍTULO 4.**

# **EXPERIMENTACIÓN**

## CAPÍTULO 4. EXPERIMENTACIÓN

### 4.1 Desarrollo experimental

#### 4.1.1 Reactivos

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada 18 M $\Omega$  cm. Las soluciones del ácido: *t*-cinámico, *m*-cumárico, *o*-cumárico y *p*-cumárico se realizaron con reactivos analíticos Sigma (98.0 %) y metanol (grado cromatográfico Merck). DPPH, Ácido (S)-(-)-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico o Trolox (97%). Se trabajó con ácido clorhídrico (Merck 1.19 g/mL, 37%) e hidróxido de sodio (Merck 99 %).

Para los de biosensores se utilizaron las enzimas Lacasa (Laccase from *Trametes Versicolor*, Sigma EC1.10.3.2, 120 unit/mg sólido) y Tirosinasa (Tyrosinase from mushrooms, Sigma, EC 1.14.18.1, 3900 unit/mg sólido)

#### 4.1.2 Equipo

Se usó un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer Lambda 20). El pH de las disoluciones fue ajustado empleando un pH-metro Mettler Toledo MP230.

Las mediciones amperométricas se realizaron en una celda termoregulada bajo agitación constante, con un amperímetro BAS amperometric detector LC-4C conectado a una PC, la recopilación de datos se realiza mediante el software especializado DAYS LAB 6.0.

#### 4.2.3 Metodología

##### 4.2.3.1 Computacional

Las optimizaciones de geometrías y los cálculos de frecuencia se llevaron a cabo utilizando el funcional M05-2X y el conjunto de funciones de bases 6-311++G(d,p). El funcional M05-2X ha sido recomendado para los cálculos cinéticos por sus desarrolladores y también se ha utilizado con éxito por autores independientes [58]. Es también uno de los funcionales con mejor desempeño para el cálculo de energías de reacción que involucran RL. Los cálculos se realizaron con el paquete de programas Gaussian 09, las correcciones termodinámicas fueron incluidas en el cálculo de las energías relativas. Los efectos de solvente fueron incluidos usando el modelo de solvatación continuo SMD a nivel M05-2X/6-311++G(d, p), utilizando el agua como solvente.

Para los cálculos de constantes de velocidad se utilizó la teoría convencional del estado de transición (TST) [59].

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT} \quad (11)$$

donde  $k_B$  y  $h$  son las constantes de Boltzman y Planck,  $\Delta G^\ddagger$  es la energía libre de activación,  $\sigma$  es la degeneración de caminos de reacción y  $\kappa$  la corrección de tunelaje.

Para la correcta identificación de estados de transición se realizaron cálculos de coordenadas intrínsecas de reacción (IRC), además de una inspección visual del vector de transición.

En el caso de los mecanismos que involucran transferencias electrónicas se utilizó la teoría de Marcus [60]. En esta teoría la barrera de activación ( $\Delta G_{ET}^\ddagger$ ) se obtiene como:

$$\Delta G_{ET}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left( 1 + \frac{\Delta G_{ET}^0}{\lambda} \right)^2 \quad (12)$$

donde  $\Delta G_{ET}^0$  es la energía libre de reacción y  $\lambda$  la energía de reorganización nuclear.

Los cálculos de los espectros UV-Vis se realizaron a un nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311++G(d,p), utilizando el modelo de solvente SMD.

#### 4.2.3.2 Experimental

##### *Estabilidad*

Se preparó una solución 0.1 M de HCl en 25 mL y otra de la misma concentración de NaOH en 50 mL, y se preparó una solución de ácido (ácido cafeico, *p*-cumárico o *t*-cinámico) en 10 mL.

Una vez teniendo las soluciones, en una celda se colocan 5 mL de HCl 0.1 M a la que se le añade un pequeño volumen de ácido propuesto y se colocan 2.5 mL en la celda de cuarzo para tomar lectura en el equipo de UV-vis. Para el NaOH se realizó el mismo procedimiento y se toma lectura del espectro cada hora.

##### *Cálculo de las constantes de acidez*

En una celda adaptada para mantener la temperatura a 25 °C se colocaron 5 mL de HCl 0.1 M + 50  $\mu$ L del DAHC, a esta solución se le agrega NaOH 0.1 M con el DAHC, con el fin

de variar el  $pH$  en intervalos de aproximadamente 0.3 unidades, desde  $pH$  1.50 hasta 12.00. A cada medición de  $pH$  se le toma lectura del espectro de absorción.

Una vez obtenidos los espectros de absorción se utiliza el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez.

#### *Estimación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH*

Se preparó una solución de DPPH  $10^{-3}$  M en etanol, es decir, 9.9 mg de DDPH en 25 mL de etanol, se guarda en un frasco obscuro y se mantiene a 4 °C, También se preparó una solución de Trolox de la misma concentración, 6.5 mg. en 25 mL de etanol y se mantiene en las mismas condiciones que la solución de DPPH.

Se realizaron diluciones de la solución madre de Trolox ( $10^{-3}$  M) con etanol para realizar una curva de calibración en función de la absorbancia de DPPH. Se agregaron diferentes volúmenes de la solución diluida de Trolox ajustando con etanol a 1 mL y se registra la absorbancia a 514 nm (Tabla 1).

Tabla 1. Volumen de Trolox a diferentes concentraciones para la construcción de la curva de calibración

[Trolox] <sub>final</sub> ( $\mu$ M)	V <sub>DPPH</sub> at $10^{-3}$ M ( $\mu$ L)	V <sub>etanol</sub> ( $\mu$ L)	V <sub>Trolox</sub> at $10^{-5}$ M ( $\mu$ L)	V <sub>Trolox</sub> at $10^{-4}$ M ( $\mu$ L)	Absorbancia a 514 nm después de 5 min
0	100	900	0	0	①
1	100	800	100	0	
5	100	400	500	0	
10	100	800	0	100	
20	100	700	0	200	
40	100	500	0	400	
50	100	400	0	500	

En esas condiciones, la absorbancia del blanco (solución sin Trolox) debe de ser  $1.05 \pm 5\%$ .

Usando la solución de DDPH (manteniendo la concentración de  $10^{-3}$  M), se toma lectura de los espectros de absorción a 514 nm, de la mezcla Trolox-DPPH después de 5 minutos de haber iniciado la reacción.

Para las muestras se ajusta con etanol y con la solución de DPPH ( $10^{-3}$  M), se toma la absorbancia hasta que la reacción se estabiliza, esto se observa cuando la absorbancia se mantiene constante respecto al tiempo.

Se toman dos puntos de la curva Trolox y se obtiene una pendiente, se realiza lo mismo para la muestra se toman dos puntos de la parte lineal de la curva y se divide entre la concentración.

Para el cálculo del índice TEAC se divide la pendiente de la muestra entre la pendiente de la curva con Trolox.

#### *Estimación de la capacidad antioxidante por medio de biosensores enzimáticos*

En este método, la enzima se deposita sobre el electrodo de trabajo en una mezcla formada por una solución de Tirosinasa o Lacasa 5 mg/mL 10 mg/mL respectivamente. Una vez mezclados los componentes se debe agitar hasta que la mezcla es homogénea, entonces se depositan 3.0  $\mu$ L sobre el electrodo de trabajo. Los biosensores se colocan bajo una lámpara de luz UV (8W) por un intervalo de 3 horas con el fin de permitir la polimerización. Después de este tiempo se almacenan a 4°C al vacío hasta su uso.

En una celda termoregulada a 30 °C bajo agitación se colocan 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M y pH=7.00 y se sumerge el biosensor, se aplica un potencial en el cual se espera que la señal sea estable, cuando se establece la línea base se realizan adiciones consecutivas del sustrato y se mide el cambio de la corriente en función de la concentración.

Una curva de calibración se construye graficando la concentración total del sustrato en la celda en función del cambio total registrado en la corriente. La parte lineal de la curva de calibración indica el rango de respuesta mientras que la pendiente corresponde a la sensibilidad del sensor expresada en unidades de nA/ $\mu$ M.

El cociente entre cada sustrato y Trolox corresponde al valor de capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

# **CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Ácido t-cinámico

## 5.1.1 Estabilidad

En la Figura 6 se muestran los espectros de absorción del ácido t-cinámico ( $5.76 \times 10^{-5}$  M) en medio ácido (HCl 0.1 M) y medio básico (NaOH 0.1 M) en un intervalo de 7 horas después de su preparación, con el fin de observar que no haya descomposición del compuesto en alguno de los medios.

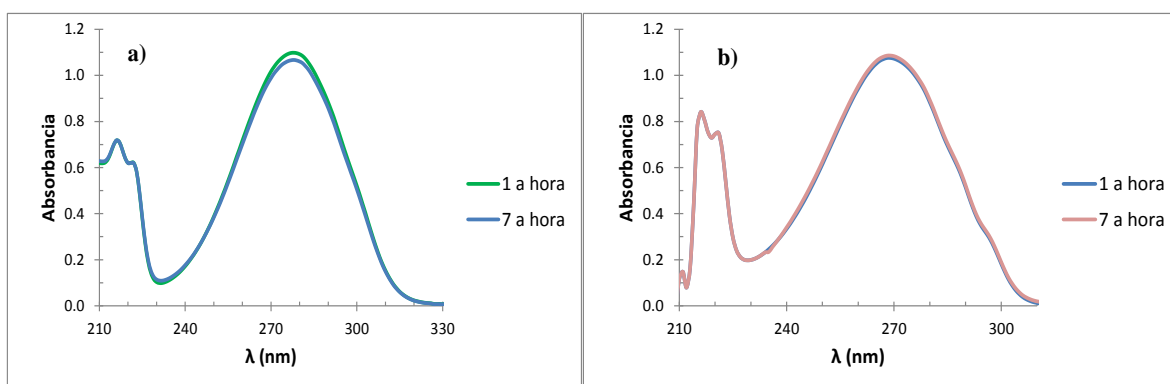


Figura 6. Espectros de absorción del ácido t-cinámico en medio a) ácido y b) básico

Se puede observar que en ambos medios hay ligeras variaciones en los espectros de absorción esto puede atribuirse al cambio de  $pH$  en la solución.

## 5.1.2 Espectros de absorción UV-Vis

La Figura 7 muestra los espectros de absorción del ácido t-cinámico a fuerza iónica 0.1. Se puede observar que en medio ácido el máximo de absorción se encuentra en aproximadamente a  $\lambda_{\max}=277$  nm y a medida que el  $pH$  aumenta, la banda de absorción se va recorriendo observándose una absorción máxima en aproximadamente  $\lambda_{\max}=267$  nm y un punto isobéptico en aproximadamente 274 nm.

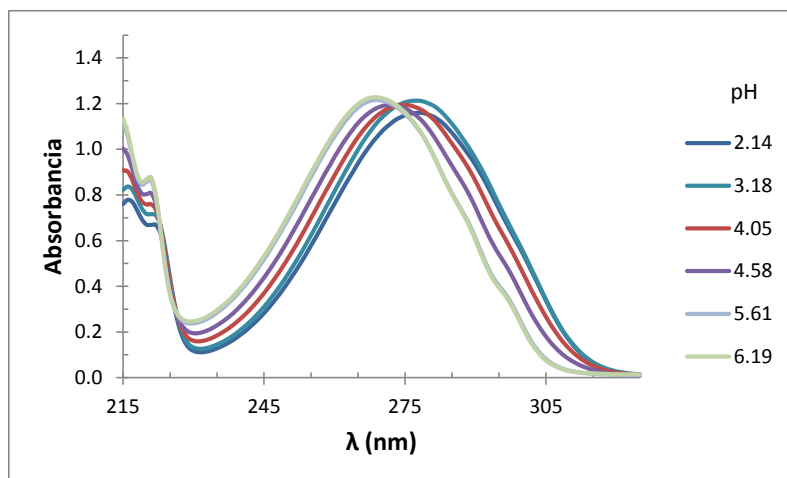


Figura 7. Espectros de absorción del ácido t-cinámico ( $5.40 \times 10^{-5}$  M) en un intervalo de  $2.14 < \text{pH} < 6.19$

### 5.1.3 Constante de acidez

Las constantes de acidez de los DAHC se determinaron en solución acuosa dado que en este medio los sistemas vivos constituyen un 70 % del peso de la mayoría de los organismos, es el medio de transporte de los nutrientes celulares y el medio de reacción en el que tiene lugar la inmensa mayoría de las reacciones químicas.

Con los datos de absorbancia en función del  $\text{pH}$  y un modelo químico propuesto se introducen al programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez.

Se alimentaron 13 espectros en el intervalo de longitud de onda de 215-325 nm obteniéndose un valor de  $\text{pK}_a$  de 4.400 con una desviación estándar sobre las constantes de 0.006 como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Valor de  $\text{pK}_a$  del ácido t-cinámico ( $5.400 \times 10^{-5}$  M) con datos de longitud de onda de 215 a 325 nm, calculado con el programa computacional SQUAD.

Concentración (M)	$\text{pK}_a$	U	$\sigma$	Datos
$5.400 \times 10^{-5}$	$4.400 \pm 0.006$	0.116	0.009	215-325

Otro de los parámetros calculados por SQUAD son los coeficientes de absorptividad molar para la especie neutra y la especie desprotonada como se muestra en la Figura 8.

Se observa que para la especie neutra tiene un coeficiente de absorptividad molar de  $22300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a una longitud de onda de 276 nm y para la especie desprotonada el coeficiente es de  $22500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 274 nm, observándose un punto isobéptico en 274 nm.



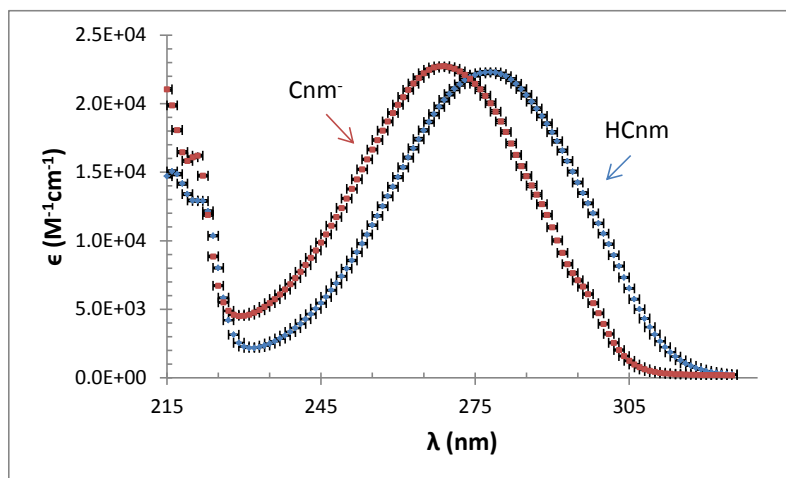


Figura 8. Coeficientes de absorptividad molar del ácido t-cinámico de la especie protonada (azul) y la especie desprotonada (rojo) y sus desviaciones estándar

A partir del valor de  $pK_a$  calculado por SQUAD se calculan las fracciones de las especies en función del  $pH$ .

En la Figura 9 se muestra el diagrama de distribución de especies para el ácido t-cinámico en su forma neutra se observa que a valores de  $pH$  ácidos la especie que predomina corresponde a la especie neutra y a partir de un poco más de 4 unidades de  $pH$  la especie aniónica comienza a predominar.

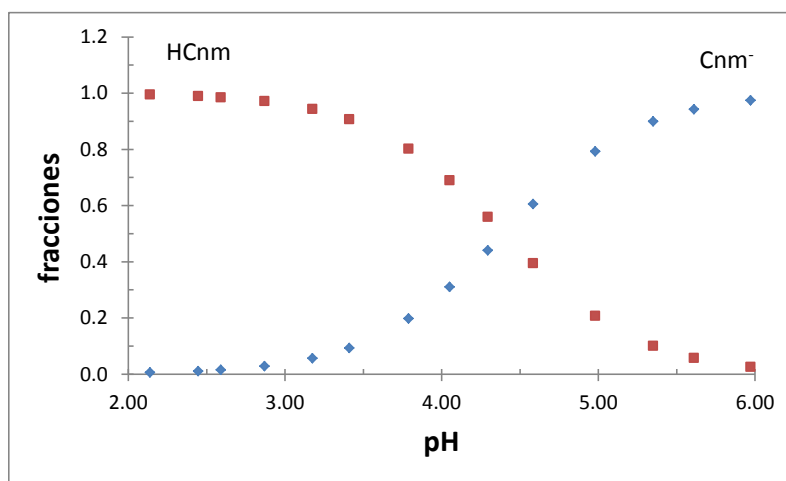


Figura 9. Diagrama de distribución de especies del ácido t-cinámico

A partir de los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD se calcularon los espectros para ambas especies. Como se observa en la Figura 10 los espectros experimentales y los simulados por SQUAD se superponen.

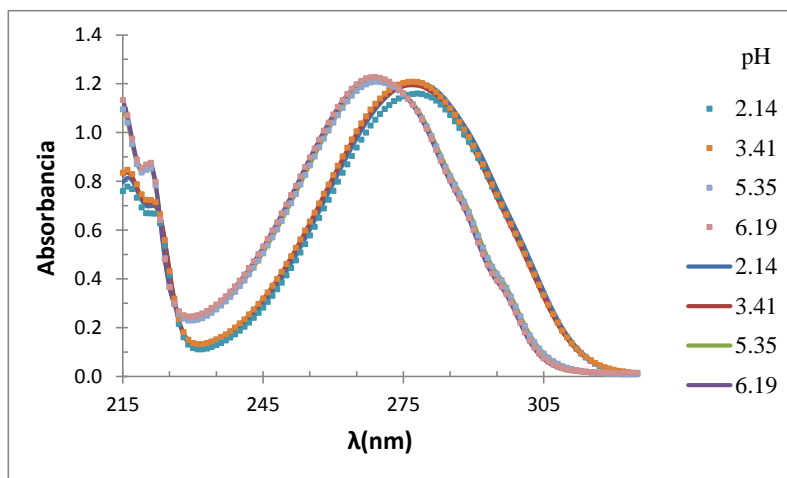


Figura 10. Espectro de absorción del ácido t-cinámico  $5.400 \times 10^{-5}$  M, el espectro calculado por SQUAD está representado con líneas y el experimental con puntos

## 5.2 Ácido *p*-cumárico

### 5.2.1 Estabilidad

En la Figura 11 se muestran los espectros de absorción del ácido *p*-cumárico ( $7.84 \times 10^{-5}$  M) en medio ácido (HCl 0.1 M) y medio básico (NaOH 0.1 M) en un intervalo de 7 horas después de su preparación, con el fin de observar que no haya descomposición del compuesto en alguno de los medios.

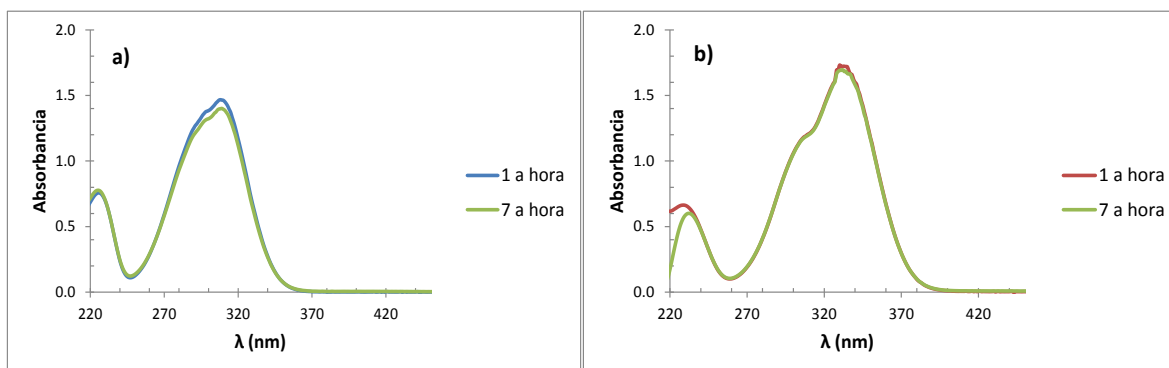


Figura 11. Espectros de absorción del ácido *p*-cumárico en medio a) ácido y b) básico

Se puede observar que en medio ácido hay pequeñas fluctuaciones en el máximo de absorción y en medio básico se observa una caída de la banda de absorción en 230 nm al pasar el tiempo, sin embargo se mantiene estable durante el intervalo de 7 horas.

### 5.2.2 Espectros de absorción experimentales

En la Figura 12 se muestra el conjunto de espectros de absorción para el ácido *p*-cumárico, se observan tres máximos de absorción, a valores de *pH* ácidos el máximo de absorción se localiza en 308 nm, a medida que aumenta el valor de *pH* a básicos la banda de absorción se recorre a 285 nm y a *pH* mayores de 8 el máximo de absorción se encuentra a 333 nm.

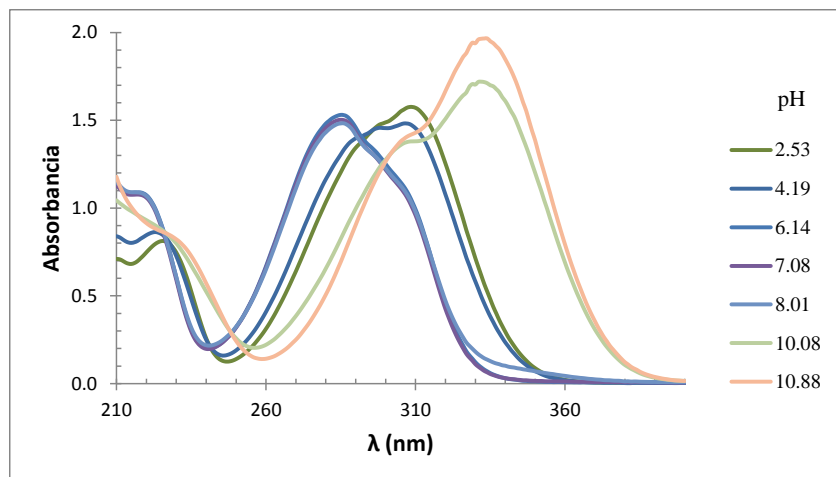


Figura 12. Espectros de absorción del ácido *p*-cumárico ( $6.353 \times 10^{-5}$  M) en un intervalo de  $2.53 < pH < 10.88$

### 5.2.3 Cálculo del valor de *pKa* experimental

Con los datos de absorbancia en función de la longitud de onda y de la concentración a diferentes valores de *pH* además de un modelo químico propuesto se alimentan el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez.

Los valores de *pKa* dados por SQUAD se muestran en la Tabla 3 en donde se observa que el primer *pKa* es de  $4.687 \pm 0.002$  y el segundo corresponde a  $9.397 \pm 0.001$ .

Tabla 3. Valores de *pKa* del ácido *p*-cumárico ( $6.353 \times 10^{-5}$  M) con datos de longitud de onda de 210 a 400 nm calculados con el programa computacional SQUAD.

Concentración (M)	<i>pKa</i> <sub>1</sub>	<i>pKa</i> <sub>2</sub>	U	σ	Datos
$6.353 \times 10^{-5}$	$4.687 \pm 0.002$	$9.397 \pm 0.004$	0.198	$6.880 \times 10^{-3}$	210-400

Los coeficientes de absorción molar para la especie neutra y sus formas aniónicas se muestran en la Figura 13 en donde se observan tres máximos de absorción en 305 para la especie neutra 284 y 335 nm para las especies aniónica y dianiónica respectivamente.

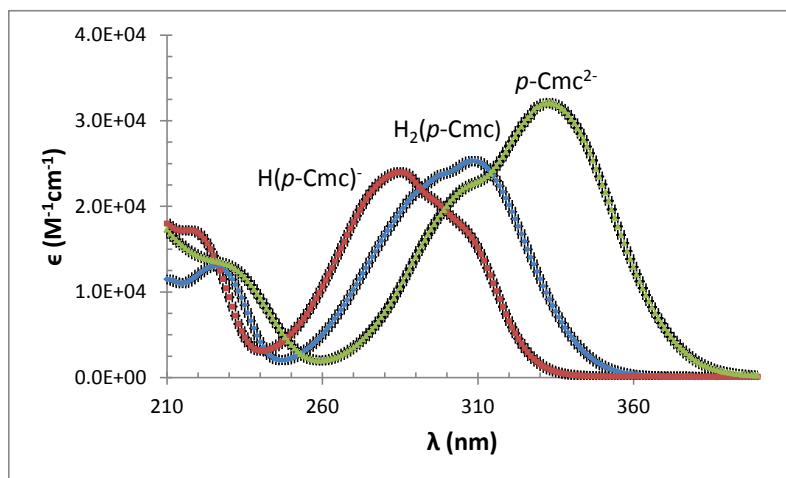


Figura 13. Coeficientes de absorptividad molar del ácido *p*-cumárico y sus desviaciones estándar. Con los valores de *pK*<sub>a</sub> calculados por SQUAD se obtienen las fracciones molares para cada especie en relación al *pH* como se muestra en la Figura 14. El ácido *p*-cumárico predomina a valores de *pH* ácidos pero a partir de *pH*=4.5 comienza a predominar la especie desprotonada y de *pH*=9 aproximadamente la especie dianiónica predomina.

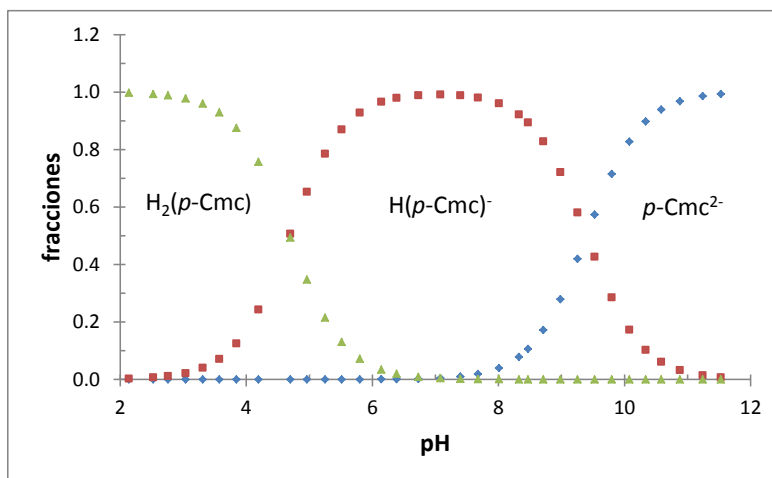


Figura 14. Diagrama de distribución de especies del ácido *p*-cumárico

A partir de los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD se calcularon los espectros de las tres especies. Como se observa en la Figura 15 los espectros experimentales a diferentes valores de *pH* y los simulados por SQUAD se superponen.

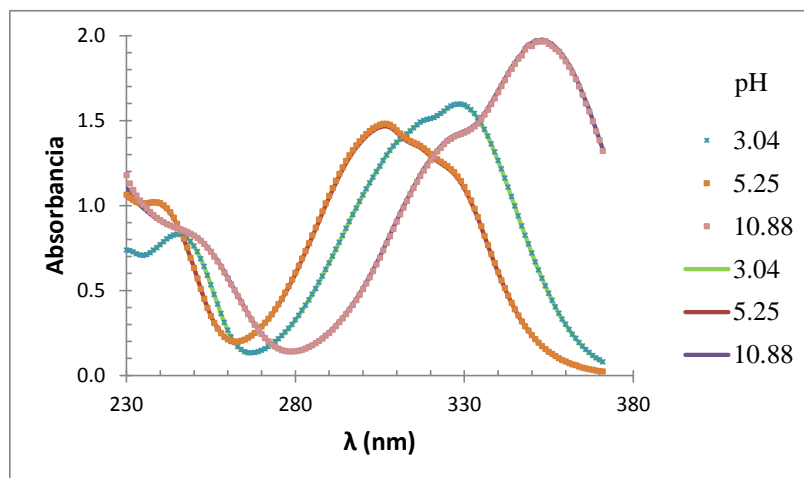


Figura 15. Espectros del ácido *p*-cumárico  $6.353 \times 10^{-5}$  M a diferentes valores de *pH*, el espectro calculado por SQUAD está representado con líneas y el experimental con puntos

### 5.3 Ácido *o*-cumárico

#### 5.3.1 Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad en medio ácido (HCl 0.1 M) y en medio básico (NaOH 0.1 M) del ácido *o*-cumárico ( $8.51 \times 10^{-5}$  M) en un intervalo de 7 horas después de su preparación, con el fin de observar que no haya descomposición del compuesto en alguno de los medios.

En la Figura 16 se observa que los espectros de absorción ácido y básico al pasar el tiempo se mantienen sin mucho cambio, por lo que este compuesto es estable durante el intervalo de tiempo establecido.

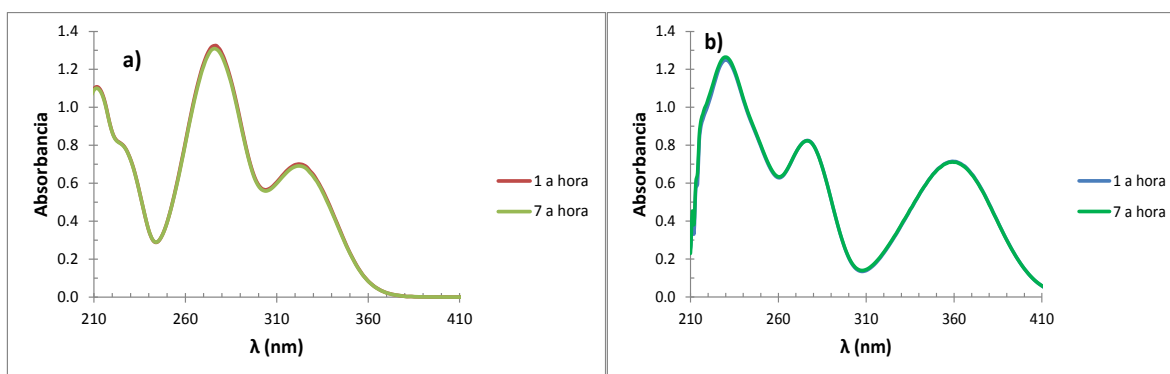


Figura 16. Espectros de absorción del ácido *o*-cumárico en medio a) ácido y b) básico

#### 5.3.2 Espectros de absorción experimentales

Los espectros de absorción del ácido *o*-cumárico a diferentes valores de *pH* se muestran en la Figura 17. Se hacen notar la presencia de dos máximos de absorción en 272 y 318 nm a

valores de  $pH$  ácido, al aumentar el valor de  $pH$  las bandas de absorción se recorren a valores de longitud de onda menores.

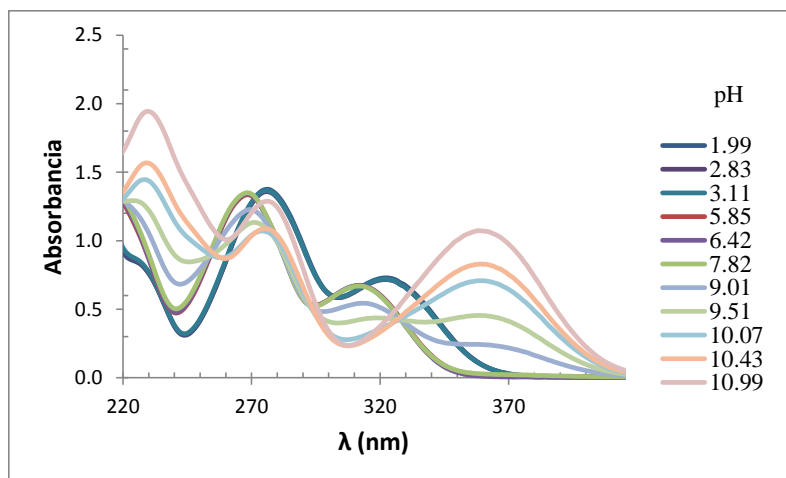


Figura 17. Conjunto de espectros de absorción del ácido *o*-cumárico ( $7.231 \times 10^{-5}$  M) en un intervalo de  $1.99 < pH < 10.99$

### 5.3.3 Cálculo del valor de $pK_a$ experimental

Las absorbancias a diferentes longitudes de onda se alimentan al programa computacional SQUAD para el cálculo de los valores de  $pK_a$ , estos valores se muestran en la Tabla 4 así como los valores de la suma de mínimos cuadrados y la desviación estándar sobre los datos de absorbancia.

Tabla 4. Valores de  $pK_a$  del ácido *o*-cumárico ( $7.231 \times 10^{-5}$  M) con datos de longitud de onda de 220 a 370 nm, calculados con el programa computacional SQUAD

Concentración (M)	$pK_{a_1}$	$pK_{a_2}$	U	$\sigma$	Datos
$7.231 \times 10^{-5}$	$4.550 \pm 0.004$	$9.517 \pm 0.002$	0.179	$6.950 \times 10^{-3}$	220-370

Los coeficientes de absortividad molar en función de la longitud de onda calculados por SQUAD se presentan en la Figura 18. Se observa que a medida que se da la desprotonación del ácido *o*-cumárico los máximos de absorción se van desplazando a longitudes de onda menores y la especie dianiónica (*o*-Cmc<sup>2-</sup>) presenta tres máximos de absorción en 228, 272 y 355 nm.

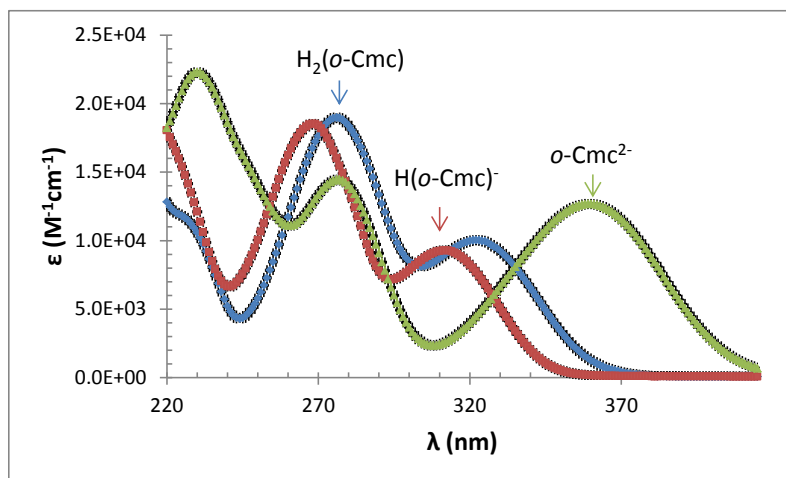


Figura 18. Coeficientes de absorptividad molar del ácido *o*-cumárico de la especie neutra (azul), la especie aniónica (rojo) y dianiónica (verde) y sus desviaciones estándar

Los valores de  $pK_a$  se utilizan para el cálculo de las fracciones molares en función del  $pH$  para obtener un diagrama de distribución de especies tal como se muestra en la Figura 19. Se observa que la especie desprotonada  $H(o-Cmc)^-$  es la que predomina sobre la especie neutra y dianiónica.

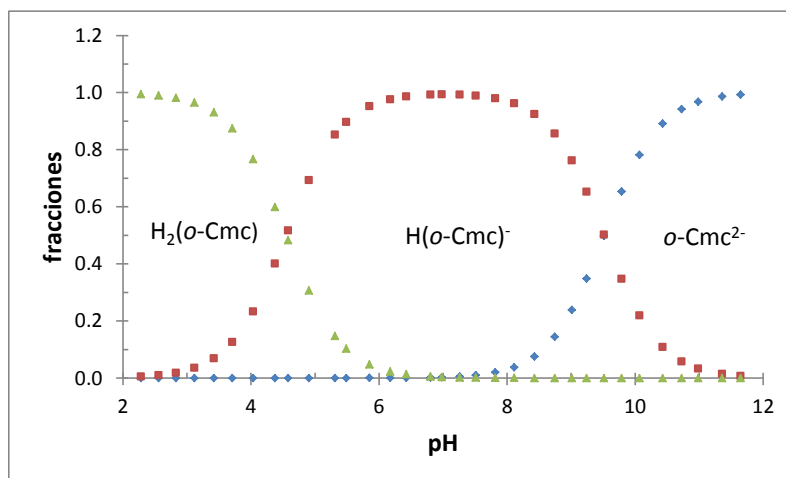


Figura 19. Diagrama de distribución de especies del ácido *o*-cumárico

En la Figura 20 se realizó un ajuste entre los espectros calculados por SQUAD a diferentes valores de  $pH$  y los obtenidos experimentalmente y se observa que el comportamiento espectral es similar ya que las bandas se superponen.

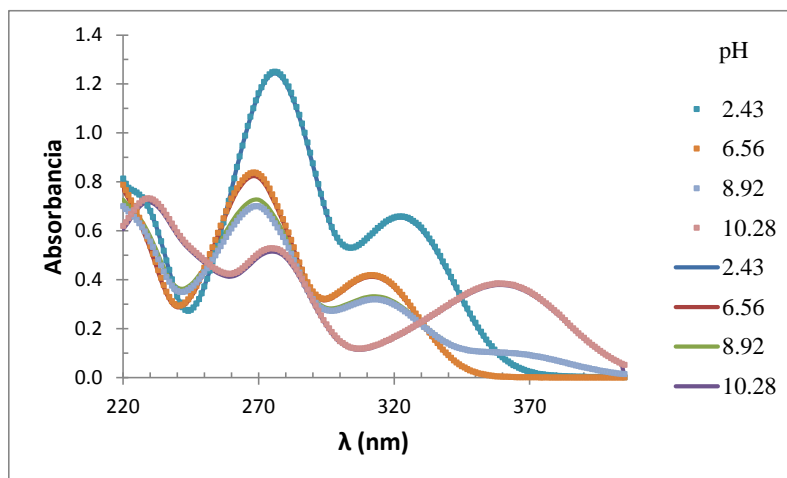


Figura 20. Espectros del ácido *o*-cumárico  $1.452 \times 10^{-4}$  M a diferentes valores de *pH*, el espectro calculado por SQUAD está representado con líneas y el experimental con puntos.

#### 5.4 Ácido *m*-cumárico

##### 5.4.1 Estabilidad

En la Figura 21 se muestra la estabilidad del ácido *m*-cumárico ( $9.36 \times 10^{-5}$  M) en medio ácido (HCl 0.1 M) y medio básico (NaOH 0.1 M) durante un intervalo de 7 horas después de su preparación.

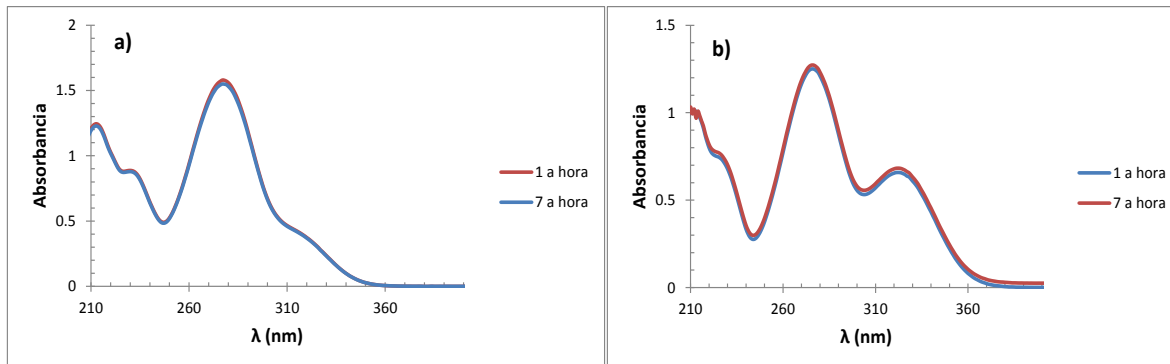


Figura 21. Espectros de absorción del ácido *m*-cumárico en medio a) ácido y b) básico

##### 5.4.2 Espectros de absorción experimentales

En la Figura 22 se muestra el conjunto de espectros de absorción del sistema no amortiguado del ácido *m*-cumárico a diferentes valores de *pH*. Se hacen notar la presencia de tres máximos de absorción en 277, 270 y 212 nm, al aumentar el valor de *pH* las bandas de absorción se recorren a valores de longitud de onda menores.



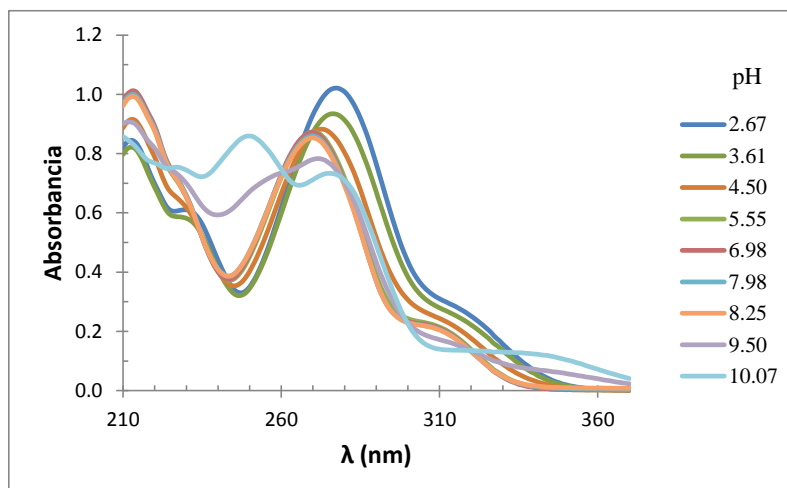


Figura 22. Espectros de absorción del ácido *m*-cumárico ( $8.378 \times 10^{-5}$  M) en un intervalo de  $2.67 < \text{pH} < 10.07$

#### 5.4.3 Cálculo de los valores de $pK_a$ experimentales

Los datos de absorbancia a diferentes valores de longitud de onda, la concentración y un modelo químico propuesto se introducen a SQUAD en donde como datos salida da los valores de  $pK_a$ , la suma de mínimos cuadrados, la desviación estándar sobre los datos de absorbancia como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de  $pK_a$  del ácido *m*-cumárico ( $8.3377 \times 10^{-5}$  M) con datos de longitud de onda de 210 a 370 nm, calculados con el programa computacional SQUAD

Concentración (M)	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	U	$\sigma$	Datos
$8.377 \times 10^{-5}$	$4.282 \pm 0.004$	$9.707 \pm 0.007$	0.155	$7.5290 \times 10^{-3}$	210-370

Otro de los parámetros calculado por SQUAD son los coeficientes de absortividad molar en función de la longitud de onda y sus respectivas desviaciones estándar de la especie neutra y aniónica como se muestra en Figura 23.

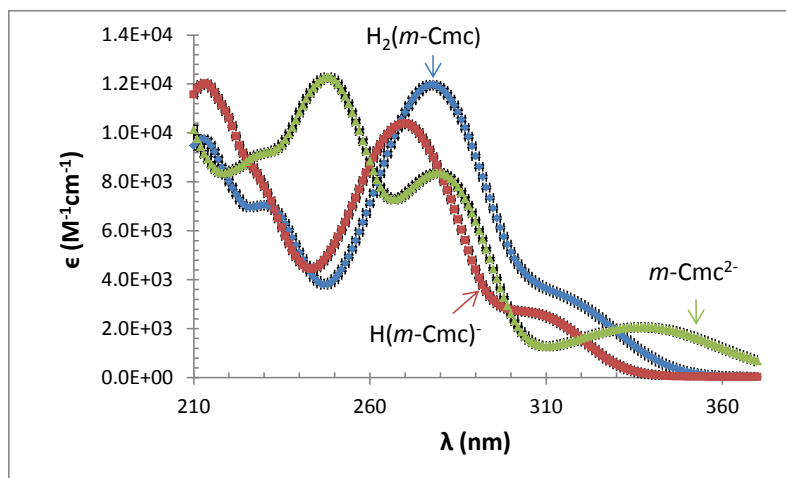


Figura 23. Coeficientes de absortividad molar del ácido *m*-cumárico de las especies: neutra (azul) aniónica (rojo) y dianiónica (verde) y sus desviaciones estándar

Con los valores de  $pK_a$  calculados por SQUAD se realiza un diagrama que indica que especie predomina en un intervalo de  $pH$ , se le denomina diagrama de distribución de especies y se muestra en la Figura 24. Se puede observar que a valores de 4.30 y 9.70 la especie predominante es el anfolito  $H(m-Cmc)^-$  y valores de  $pH$  más básicos la especie aniónica predomina.

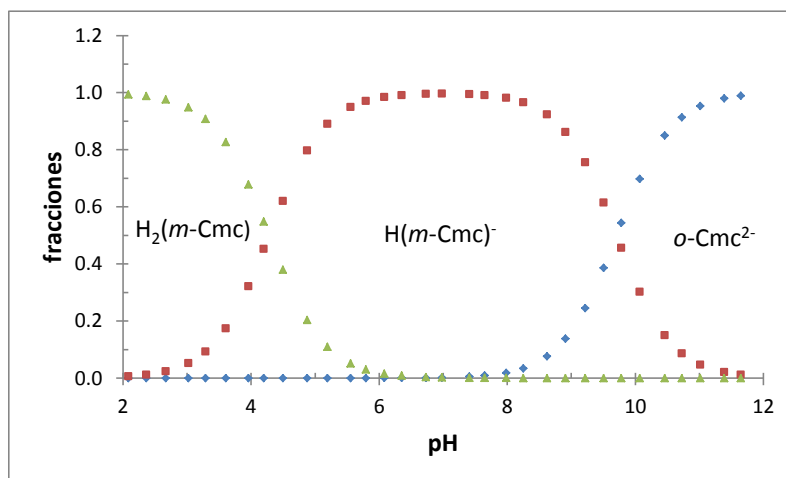


Figura 24. Diagrama de distribución de especies del ácido *m*-cumárico

Los valores de  $pK_a$  y los coeficientes de absortividad molar se utilizan para calcular los espectros dados por SQUAD que de acuerdo a la Figura 25 están representados por líneas y son ajustados con los espectros experimentales determinados de manera espectrofotométrica. Se observa que a diferentes valores de  $pH$  ambos espectros se superponen.

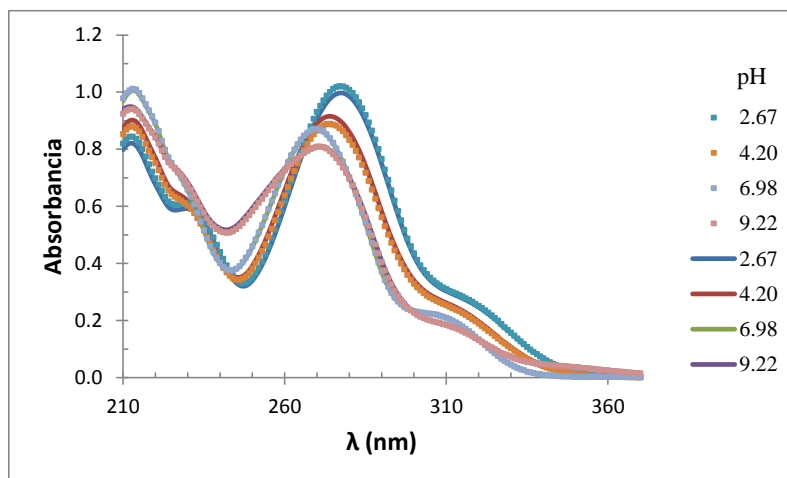


Figura 25. Espectros de absorción del ácido *m*-cumárico  $8.378 \times 10^{-5}$  M a diferentes valores de *pH*, el espectro calculado por SQUAD está representado con líneas y el experimental con puntos.

## 5.5 Ácido cafeico

### 5.5.1 Cálculo de los valores de *pKa* experimentales

En un estudio realizado por la alumna del proyecto terminal Rebeca Cervantes Trujillo de la licenciatura en química de la UAM-I se reportan las constantes de acidez por medio del programa computacional SQUAD, los resultados de estas constantes de equilibrio se reportan en la Tabla 6, así como sus respectivas desviaciones estándar y la concentración del ácido cafeico.

Se observa que la desviación estándar sobre los datos de absorbancia es del orden de  $10^{-2}$  lo que implica que el ácido es muy inestable y tiende a oxidarse, aunado a esto, el valor de la suma de los mínimos cuadrados calculados es mayor a la unidad esto se debe a la cantidad de datos que se tomaron en cuenta para realizar los cálculos de los valores de *pKa*.

Tabla 6. Constantes de acidez del ácido cafeico ( $5.653 \times 10^{-5}$  M) con datos de longitud de onda de 220 a 400 nm, calculadas con SQUAD a fuerza iónica constante (0.1)

Concentración (M)	<i>pKa</i> <sub>1</sub>	<i>pKa</i> <sub>2</sub>	<i>pKa</i> <sub>3</sub>	U	σ	Datos
$5.653 \times 10^{-5}$	$4.650 \pm 0.021$	$5.967 \pm 0.019$	$11.393 \pm 0.009$	1.293	$1.14 \times 10^{-2}$	220-400 nm

## 5.6 Determinación de la capacidad antioxidante

### 5.6.1 Ensayo con DPPH

Este método evalúa el TEAC, el cual se basa en la reducción del radical DPPH al interactuar con el antioxidante observándose una decoloración de violeta a amarillo a 514 nm.

La Figura 26 muestra el descenso de la absorbancia DPPH 100  $\mu\text{M}$  en etanol a diferentes concentraciones de Trolox en etanol en función del tiempo.

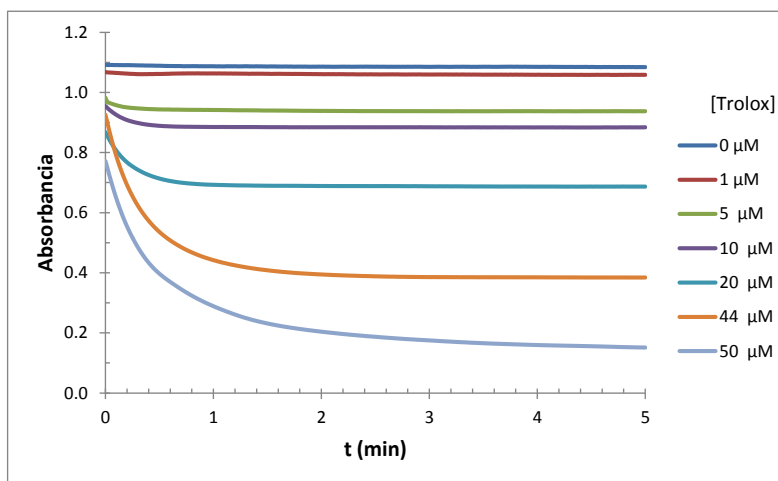


Figura 26. Absorbancia del radical DPPH en función del tiempo a diferentes concentraciones de Trolox  $\mu\text{M}$ . Con estos datos se construye una curva de calibración la cual se muestra en la Figura 27.

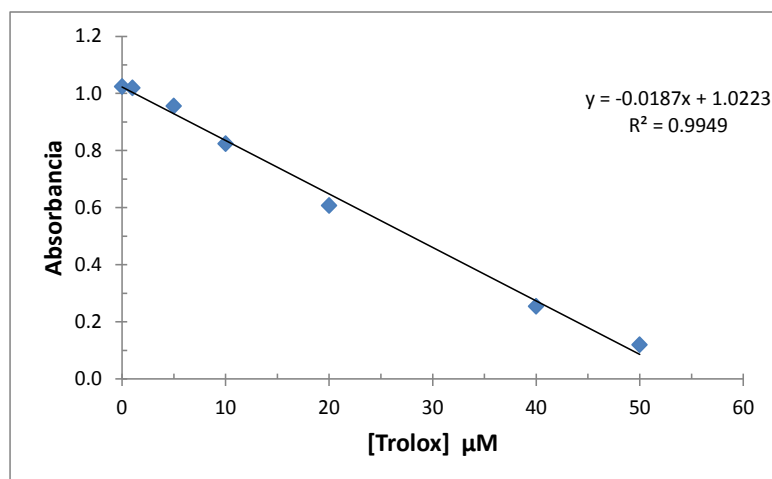


Figura 27. Curva de calibración para el sistema Trolox-DPPH en etanol

Para las muestras se mezclaron, 100  $\mu\text{L}$  del radical DPPH  $10^{-3}$  M con 500  $\mu\text{L}$  de etanol y 400  $\mu\text{L}$  del ácido hidroxicinámico y se monitorea el descenso de la absorbancia en función del tiempo (Figura 28), posteriormente se toma la absorbancia máxima y la absorbancia después de 5 minutos de iniciada la reacción a 514 nm y se calculó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

Los resultados se expresan en TEAC relativo obtenidos a partir de la curva de calibración, tomando dos puntos de esta curva entre 0 y 20  $\mu\text{M}$  en este caso, pues la absorbancia en este punto ha descendido a la mitad. Para la muestra se toman dos puntos la absorbancia inicial y la absorbancia después de 5 minutos, y se divide entre la concentración del DAHC en solución.

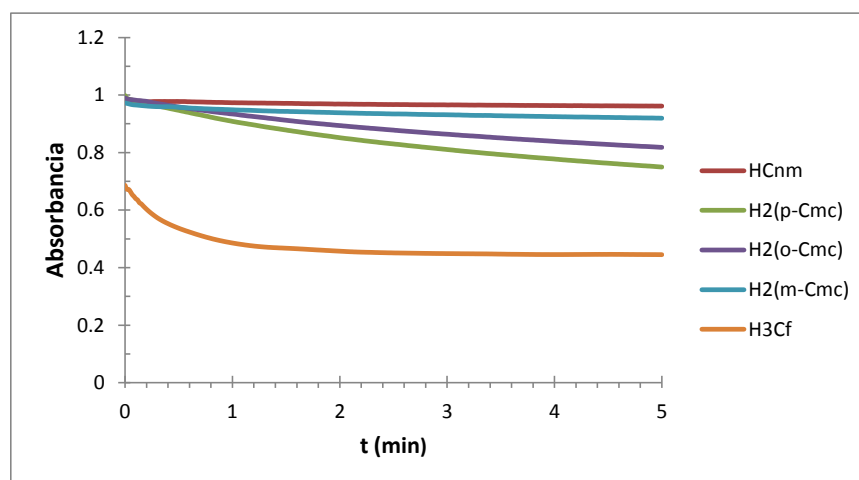
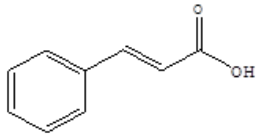
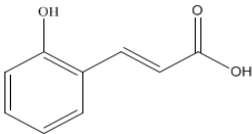
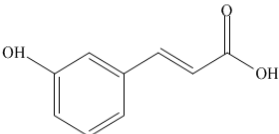
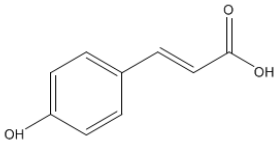
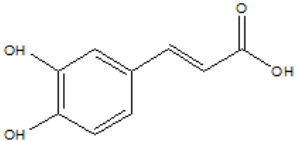


Figura 28. Disminución de la absorbancia con respecto al tiempo de los DAHC

Para obtener el valor de TEAC se realiza una relación de pendientes entre la muestra y Trolox.

En la Tabla 7 se reporta el valor de TEAC de los DAHC observándose que el ácido t-cinámico, el cual no presenta OH fenólico, tiene un valor pequeño de TEAC. La posición del OH fenólico favorece el valor TEAC en la posición *para*- como es el caso de los ácidos cumáricos.

Tabla 7. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de los DAHC con ensayo DPPH

DAHC	Estructura química	TEAC
HCnm		$9.70 \times 10^{-5} \pm 6.50 \times 10^{-5}$
H <sub>2</sub> ( <i>o</i> -Cmc)		$3.40 \times 10^{-4} \pm 6.13 \times 10^{-5}$
H <sub>2</sub> ( <i>m</i> -Cmc)		$1.40 \times 10^{-4} \pm 3.84 \times 10^{-5}$
H <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Cmc)		$4.40 \times 10^{-4} \pm 8.05 \times 10^{-5}$
H <sub>3</sub> Cf		$1.08 \pm 0.63$

### 5.6.2 Determinación amperométrica con biosensores

La detección amperométrica de los compuestos fenólicos fue realizada con el método de adiciones. Con el biosensor inmerso en una celda termo regulada y bajo agitación que contiene 10 mL de buffer 0.1 M de fosfatos *pH* 7.0 a 25°C. Se aplica el potencial indicado y se espera hasta que la corriente sea estable. Cuando se alcanza esta línea base se realizan adiciones consecutivas de pequeños volúmenes de la solución del compuesto.

Se construye una curva de calibración graficando la concentración total del sustrato en la celda en función del cambio total registrado en la corriente. La parte lineal de la curva de calibración indica el rango de respuesta mientras que la pendiente corresponde a la sensibilidad del sensor. Esta determinación se realizó utilizando dos enzimas: Lacasa y Tirosinasa, la primera enzima cataliza la oxidación de sustratos fenólicos, actuando sobre *p*-difenoles y *o*-fenoles, mientras que la Tirosinasa actúa sobre los monofenoles y bifenoles en posición *orto*.

## 5.6.2.1 Lacasa

En la Figura 29 se muestra la corriente en función de la concentración total de Trolox.

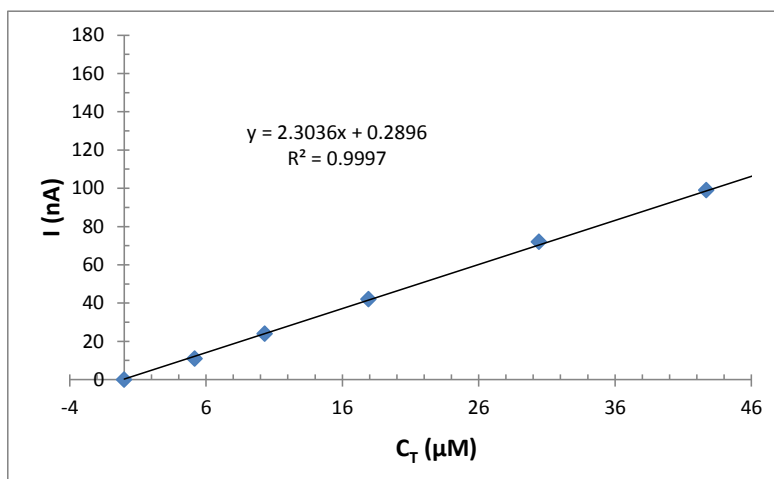


Figura 29. Curva de calibración amperométrica para Trolox

Utilizando Lacasa en el biosensor el ácido *t*-cinámico y el ácido *m*-cumárico no presentan cambio en la señal de la corriente.

La Figura 30 muestra las curvas de calibración para los ácidos *p*-cumárico y *o*-cumárico ( $1 \times 10^{-2}$  M).

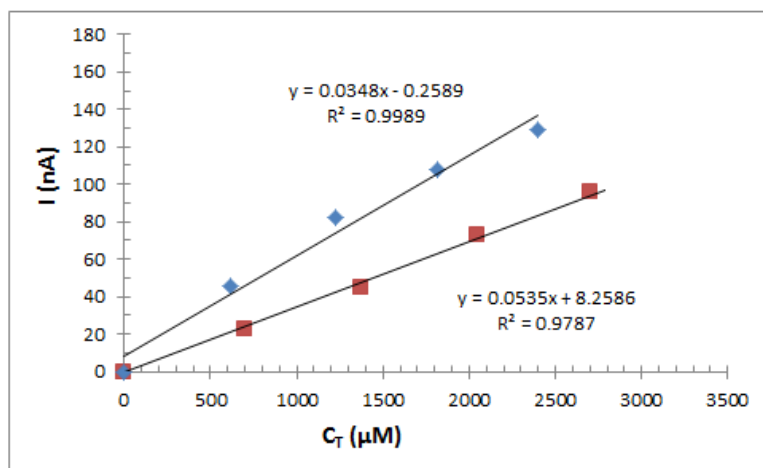


Figura 30. Curvas de calibración del ácido *p*-cumárico (puntos azules) y el ácido *o*-cumárico (puntos rojos)

Se realizaron adiciones de  $10 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{Cf}$   $0.025 \text{ M}$  a una celda (que regula la temperatura a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) con  $10 \text{ mL}$  de buffer de acetatos, se registra el cambio de corriente con respecto a la concentración como se muestra en la Figura 31.

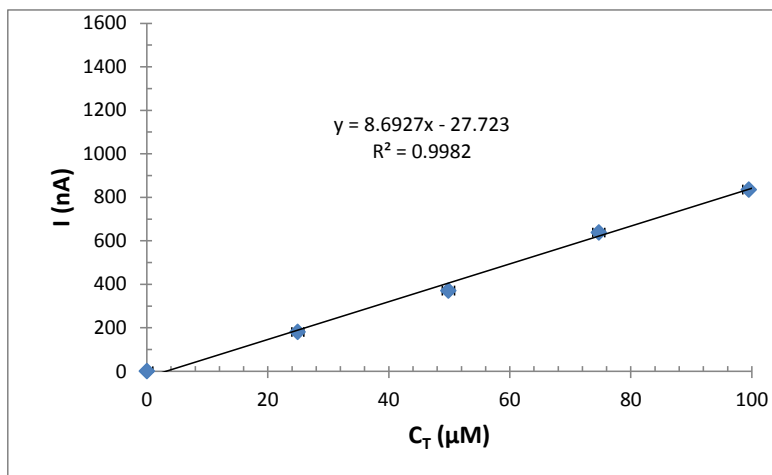


Figura 31. Curva de calibración del ácido cafeico

En la Tabla 8 se muestra la estructura química y el valor de la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox determinado con Lacasa.

Tabla 8. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) con biosensores de Lacasa

DAHC	Estructura química	TEAC
HCnm		-----
H <sub>2</sub> ( <i>o</i> -Cmc)		0.015 ± 0.001
H <sub>2</sub> ( <i>m</i> -Cmc)		-----
H <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Cmc)		0.023 ± 0.002
H <sub>3</sub> Cf		3.783 ± 0.071



La detección amperométrica con la enzima Lacasa no muestra actividad para el ácido t-cinámico, no muestra actividad con la posición *meta*- del ácido cumárico, muestra mayor actividad en la posición para seguida de la posición *orto*-, el valor de TEAC es mayor para el ácido cafeico que posee en su estructura un grupo catecol.

#### 5.6.2.2 Tirosinasa

En la Figura 32 se muestra la curva de calibración realizada con Trolox.

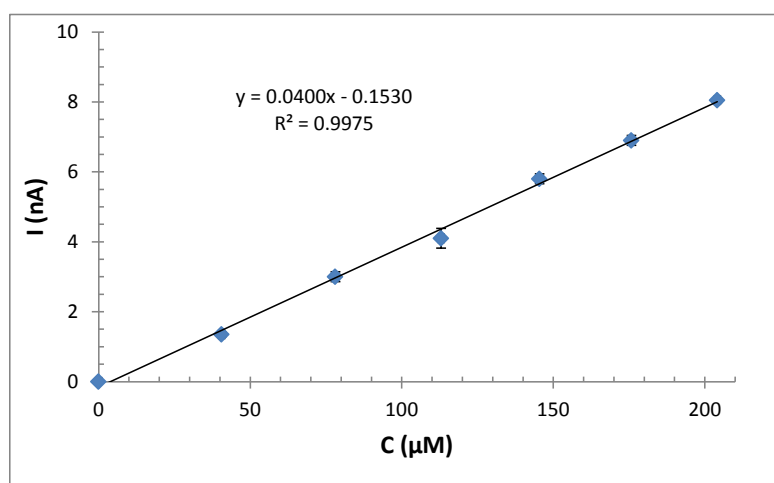


Figura 32. Curva de calibración con Trolox

El ácido t-cinámico no muestra cambio de la corriente con respecto a la concentración. Las curvas de calibración correspondientes a los ácidos cumáricos se muestran en la Figura 33, la pendiente para el ácido *p*-cumárico (triángulos) es de 0.088, la del ácido *o*-cumárico (representado por cuadros) es de 0.045 y la del ácido *m*-cumárico (rombos) es de 0.022.

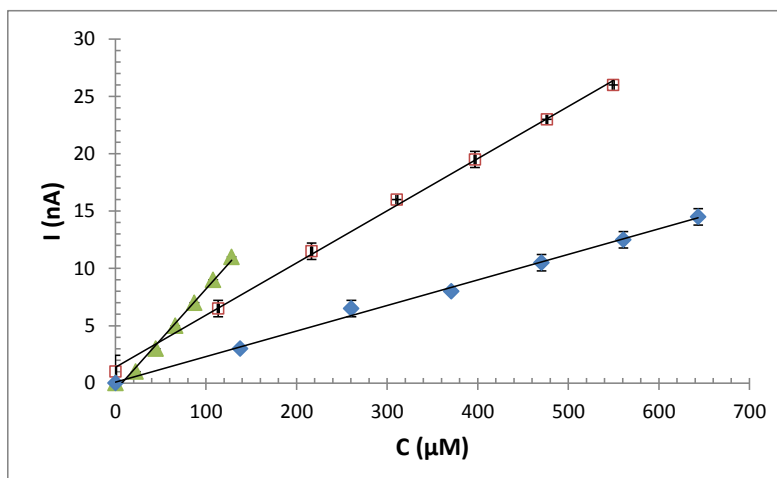


Figura 33. Curvas de calibración para los ácidos: *p*-cumárico (triángulos), *o*-cumárico (cuadros), *m*-cumárico (rombos)

En la Figura 34 se muestra el cambio de la corriente con respecto a la concentración del ácido cafeico.

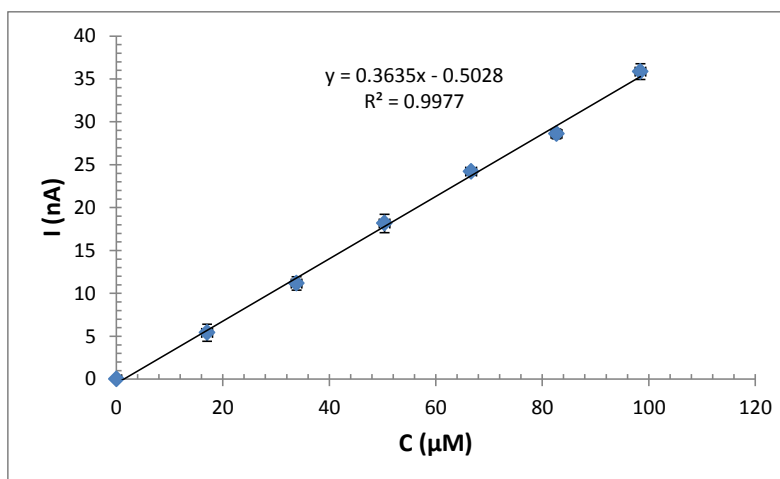
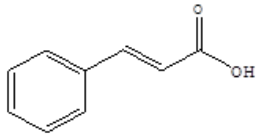
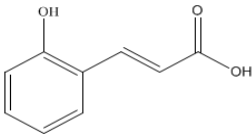
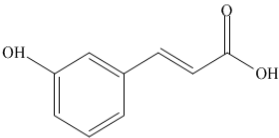
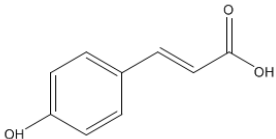
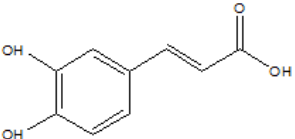


Figura 34. Curva de calibración del ácido cafeico

El valor de TEAC se obtiene dividiendo la pendiente de Trolox entre la pendiente de cada DAHC, estos valores se reportan en la Tabla 9.

Tabla 9. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) con biosensores de Tirosinasa

DAHC	Estructura química	TEAC
HCnm		-----
H <sub>2</sub> ( <i>o</i> -Cmc)		1.176 ± 0.189
H <sub>2</sub> ( <i>m</i> -Cmc)		0.576 ± 0.131
H <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Cmc)		1.554 ± 0.107
H <sub>3</sub> Cf		3.966 ± 0.238

La detección amperométrica con Tirosinasa y Lacasa no muestran actividad para el ácido *t*-cinámico, se observa que hay un valor mayor de TEAC del ácido *p*-cumárico con respecto al ácido *o*-cumárico y al *m*-cumárico esta tendencia también se observa con el ensayo con DPPH y la detección amperométrica con Lacasa y Tirosinasa muestran un mayor valor de TEAC para el ácido cafeico.

Puesto que en el ensayo con DPPH y las determinaciones amperométrica con Lacasa y Tirosinasa el ácido cafeico muestra un mayor valor de TEAC que se le atribuye al grupo catecol y dado que la posición *meta*- del ácido cumárico con la determinación amperométrica con Lacasa muestra valores menores de TEAC con respecto a sus isómeros *para*- y *orto*- se utilizó ácido gálico para observar el efecto de la posición de los OH's fenólicos sobre la capacidad antioxidante. Este ácido posee un OH fenólico en posición *meta*- un grupo catecol y un OH del ácido carboxílico (Figura 35).

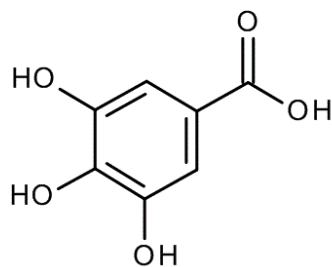


Figura 35. Estructura química del ácido gálico

Se determinó la capacidad antioxidante del ácido gálico ( $10^{-4}$  M) en equivalentes Trolox con el ensayo DPPH observándose un valor mayor de TEAC que el ácido cafeico, la determinación amperométrica con el biosensor de Lacasa muestra un valor mayor de TEAC para el ácido cafeico, por lo que se utilizó un biosensor de Tirosinasa este muestra un mayor valor de TEAC para el ácido cafeico, por lo que la actividad de la enzima Lacasa se ve limitada en la posición meta de los compuestos fenólicos.

En la Tabla 10 se reportan los valores de TEAC para el ensayo con DPPH y las determinaciones amperométricas con Lacasa y Tirosinasa.

Tabla 10. Valor de TEAC del ácido gálico con el ensayo con DPPH y determinaciones amperométricas con Lacasa y Tirosinasa

Método	TEAC
Ensayo con radical DPPH	$1.249 \pm 0.678$
Determinación con biosensor de Lacasa	$1.618 \pm 0.055$
Determinación con biosensor de Tirosinasa	$7.191 \pm 0.804$

La discrepancia entre los valores obtenidos de TEAC entre los diferentes métodos se debe a que en las determinaciones amperométricas con las enzimas Lacasa y Tirosinasa actúan sobre estructuras diferentes, el ensayo con DPPH muestra un valor mayor de TEAC para compuestos difenólicos y trifenólicos.

En los dos métodos, el ensayo con DPPH y la determinación amperométrica, se observa que en la posición *meta*- del ácido cumárico el valor de TEAC es menor que la posición *orto*- y *para*- pues el grupo hidroxilo enlazado al anillo aromático es un orientador de las posiciones *orto*- y *para*-, estas posiciones suministran electrones y se convierten en centros de densidad electrónica negativa alta que activan el anillo aromático.

## 5.7 Estudio teórico

### 5.7.1 Orden de desprotonación

El ácido t-cinámico solo posee un grupo ácido en su estructura, el carboxílico. Los ácidos cumáricos poseen dos protones ácidos, el del ácido carboxílico y el del OH fenólico. El ácido cafeico posee tres posibles sitios de desprotonación, uno carboxílico y dos fenólicos, como se observa en la Figura 36.

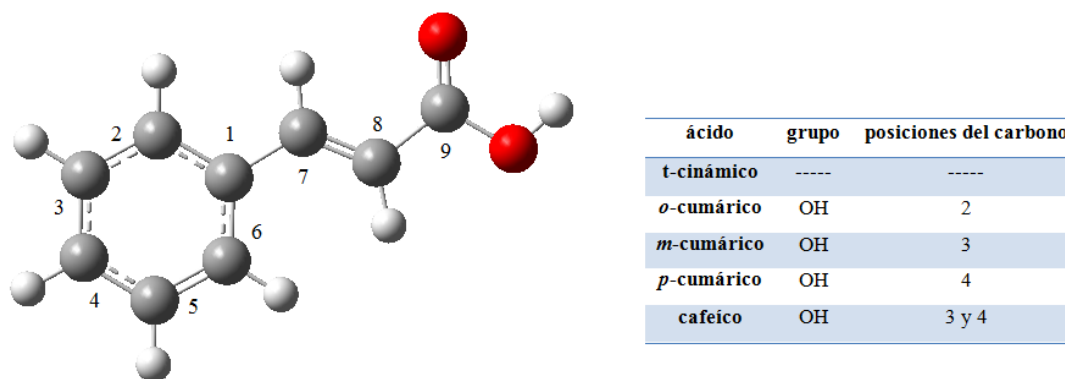


Figura 36. DAHC de acuerdo a su grupo OH sustituyente

De acuerdo a las energías libres de Gibbs calculadas en kcal/mol el orden de desprotonación para los ácidos cumáricos corresponde al sitio 9 seguido del OH unido al anillo aromático como era de esperarse, para el ácido cafeico se observa que se desprotona el sitio 9, después el sitio 3 y por último el sitio 4, esto se debe a que los OH's fenólicos están más estabilizados por el anillo aromático y el enlace es más fuerte comparado con un OH del ácido carboxílico de la cadena lateral. En la Tabla 11 se muestran las energías libres de Gibbs para cada camino de desprotonación de cada ácido.

Tabla 11. Energías libres de Gibbs estándar de desprotonación sucesivas (kcal/mol)

DAHC	Sitio	1ª desprotonación	2ª desprotonación	3ª desprotonación
<b>HCnm</b>	9	6.62		
	2	13.69	16.57	
<b>H<sub>2</sub>(<i>o</i>-Cmc)</b>	9	7.34		
	3	16.76	18.43	
<b>H<sub>2</sub>(<i>m</i>-Cmc)</b>	9	6.69		

$H_2(p\text{-Cmc})$	4	14.31	17.24	
	9	7.30		
$H_3Cf$	3	16.47	13.39	
	4	10.83	17.77	26.43
	9	7.75		

### 5.7.2 Espectros de absorción UV-Vis

Se calcularon los espectros de absorción de las especies neutra y aniónicas de los DAHC con el funcional CAM-B3LYP y el conjunto de base 6-311++ G (d, p) y el modelo de solvente SMD.

Con los valores de  $pK_a$  obtenidos experimentalmente se calcularon las fracciones molares de cada especie a diferentes valores de  $pH$  y se multiplicó por la absorbancia de las especies neutras y aniónicas y estas contribuciones se suman para obtener la absorbancia observada en función de la longitud de onda a diferentes valores de  $pH$ .

En la Figura 37 se observan tres máximos de absorción en 284, 278 y 269 nm. A medida que el  $pH$  aumenta la banda del máximo de absorción se recorre observándose un desplazamiento hipsocrómico, el mismo comportamiento lo muestran los espectros de absorción experimentales, sus máximos de absorción se encuentran en 277 y 267 nm.

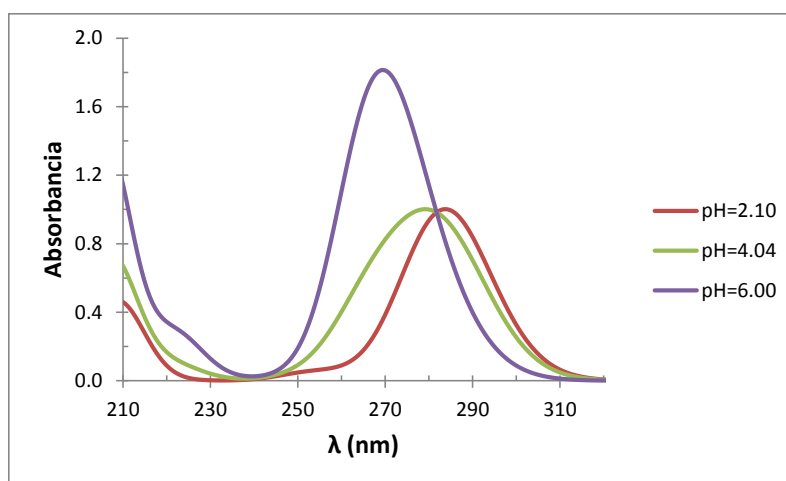


Figura 37. Espectros de absorción teóricos del ácido t-cinámico calculados con el funcional CAM-B3LYP a diferentes valores de  $pH$

La Figura 38 muestra el conjunto de espectros a diferentes valores de  $pH$  donde se pueden apreciar 2 máximos de absorción en aproximadamente 312, 292 nm. A medida que

aumenta el  $pH$  hay un desplazamiento a longitudes de onda menores. En los espectros experimentales se hacen notar la presencia de dos máximos de absorción en 317 y 272 nm a valores de  $pH$  ácido, al aumentar el valor de  $pH$  las bandas se recorren como en los espectros teóricos.

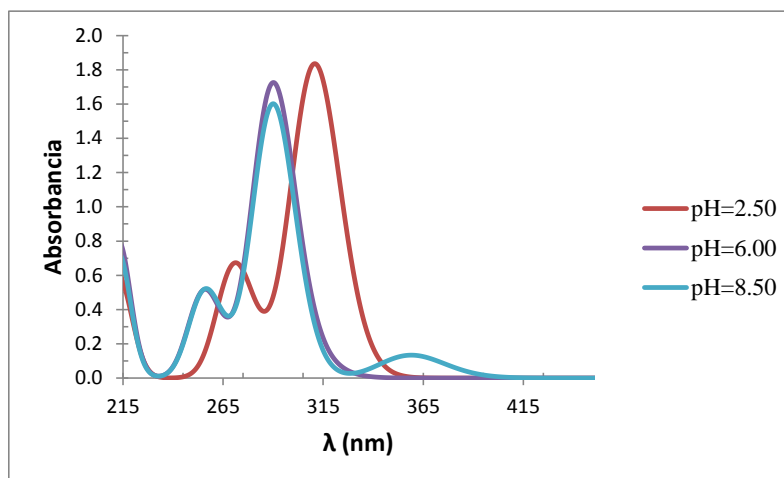


Figura 38. Espectros de absorción del ácido *o*-cumárico obtenidos con el funcional CAM-B3LYP a diferentes valores de  $pH$

En la Figura 39 se observa que a medida que el  $pH$  aumenta las bandas de absorción se recorren hacia longitudes de onda menores, a  $pH = 2.50$  se muestran 2 máximos de absorción en 275 y 293 nm y a  $pH$  básicos solo muestra un máximo de absorción en 273 nm. Este desplazamiento de las bandas lo presentan también los espectros de absorción experimentales en ellos aparecen tres máximos de absorción en 277, 270 y 212 nm.

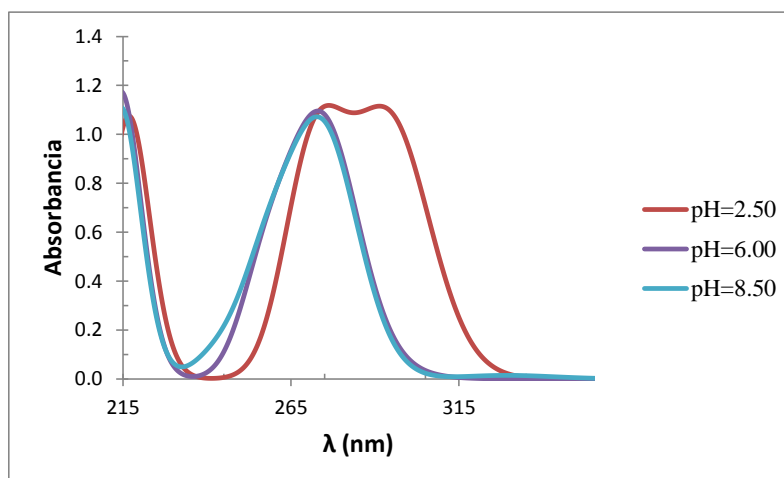


Figura 39. Espectros de absorción teóricos del ácido *m*-cumárico calculados con el funcional CAM-B3LYP a diferentes valores de  $pH$

La Figura 40 muestra un conjunto de espectros de absorción a diferentes valores de  $pH$  donde se pueden apreciar 3 máximos de absorción en aproximadamente 301, 303 y 320 nm, y se observan unos hombros en aproximadamente en 219 nm a medida que aumenta el  $pH$  hay un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción. En los espectros experimentales se observan tres máximos de absorción, a valores de  $pH$  ácidos el máximo de absorción se localiza en 285 nm, a medida que aumenta el valor de  $pH$  a básicos la banda de absorción se recorre a 309 nm y a  $pH$  mayores de 8 el máximo de absorción se encuentra a 333 nm.

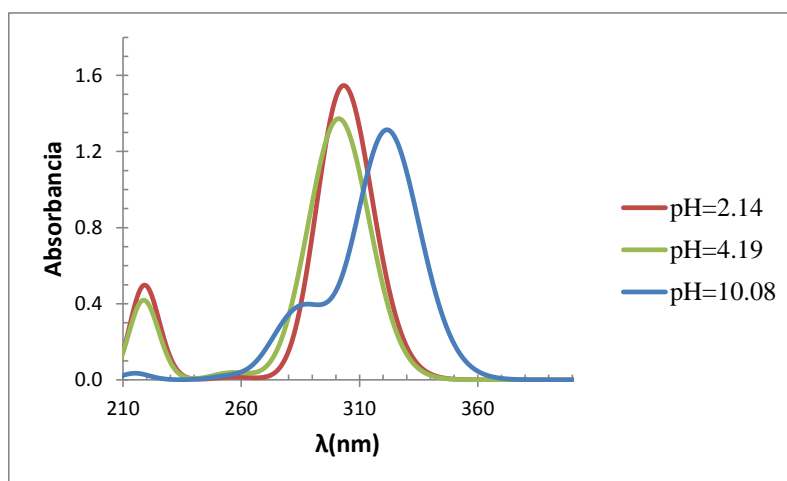


Figura 40. Espectros de absorción teóricos del ácido *p*-cumárico calculados con el funcional CAM-B3LYP a diferentes valores de  $pH$

Se calcularon los espectros de absorción teóricos con 6 estados electrónicos excitados a diferentes valores de  $pH$  como se observa en la Figura 28. A valores de  $pH$  ácidos se muestran dos bandas de absorción máxima en 310 y 225 nm y un hombro en 269 nm, al pasar a valores de  $pH$  básicos aparecen tres bandas de absorción máximas en 324, 276 y 224 nm.



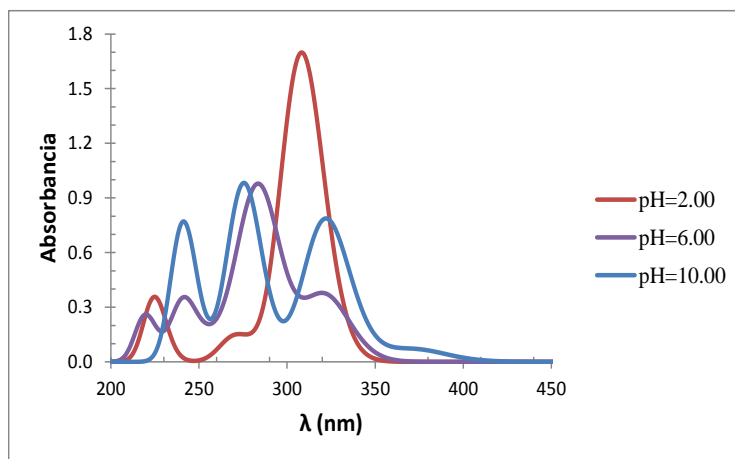


Figura 41. Espectros de absorción teóricos calculados con el funcional CAM-B3LYP del ácido cafeico a diferentes valores de  $pH$

Los espectros teóricos y experimentales de los ácidos cumáricos muestran un efecto hipsocrómico para la desprotonación del ácido carboxílico, al formarse el anión fenóxido se observa un efecto batocrómico en el isómero *para*- puesto que está más estabilizado por medio de resonancia con el anillo aromático y hay un aumento en la conjugación en este isómero con respecto a las posiciones *orto*- y *meta*-.

### 5.7.3 Cálculo de valores de $pK_a$

Para hacer una comparación del valor de  $pK_a$  obtenido experimentalmente se calculó el valor de  $pK_a$  con tres esquemas de reacción estudiados por Ho y Coote [32], el esquema A (esquema directo) el D (esquema de intercambio protónico) y E1 [61] (esquema de cúmulo continuo) (Anexo B). Estos esquemas permiten la maximización de la cancelación de los errores, algunos de ellos conservan el mismo número y tipo de especies cargadas en ambos lados de la ecuación química lo que permite realizar buenas estimaciones de valores de  $pK_a$ .

En la Tabla 12 se reportan los esquemas de reacción con sus expresiones de cálculo de valores de  $pK_a$ .

Tabla 12. Esquemas de reacción, equilibrios y las expresiones correspondientes para el cálculo de  $pK_a$ .

Esquema	Equilibrio	$pK_a =$
A	$HA \leftrightarrow H^+ + A^-$	$\frac{\Delta G_s}{RT \ln(10)}$

D	$HA + Ref^- \leftrightarrow A^- + HRef$	$\frac{\Delta G_s}{RT \ln(10)} + pKa(Href)$
E1	$HA + OH^-(3H_2O) \leftrightarrow A^-(H_2O) + 3H_2O$	$\frac{\Delta G_s}{RT \ln(10)} + 14 + 3 \log[H_2O]$

En donde  $\Delta G_s$  es la energía libre de Gibbs en solución. El  $Href$  que se utilizó fue el ácido butanoico con valor de  $pKa$  de 4.82 [62] para el ácido t-cinámico, para los ácidos cumáricos se utilizó el ácido butanoico y fenol y para el ácido cafeico ácido butanoico, fenol y catecol.

En la Tabla 13 se muestran los valores del cálculo del valor de  $pKa$  para cada ácido con los esquemas de reacción antes mencionados, se compararon con los valores de  $pKa$  experimentales y se obtuvo el error absoluto y por último el promedio general de cada esquema mostrando que el esquema D no pasa de las dos unidades y el esquema E1 no pasa de la unidad lo que indica que la estimación de  $pKa$  con el esquema E1 es bueno para los DAHC.

Tabla 13. Cálculo del valor teórico de  $pKa$  de los ácidos hidroxicinámicos con diferentes esquemas de reacción

Ácido	Esquemas			Error absoluto		
	A	D	E1	A	D	E1
<b>t-cinámico</b>	2.67	3.25	3.47	2.67	1.15	0.93
<b>o-cumárico</b>	11.51	9.89	3.86	6.96	5.34	0.69
	18.53	14.80	10.27	9.01	5.28	0.75
<b>m-cumárico</b>	5.19	3.57	3.56	0.91	0.71	0.72
	13.55	9.82	10.54	3.84	0.11	0.85
<b>p-cumárico</b>	5.37	3.75	4.21	0.68	0.94	0.48
	12.68	8.95	9.81	3.28	0.45	0.41
	5.72	4.08	3.67	1.18	0.46	0.87
<b>Cafeico</b>	13.07	8.07	8.28	7.02	2.02	2.23
	16.23	10.90	10.92	4.83	0.50	0.48
<b>error promedio</b>				<b>4.04</b>	<b>1.70</b>	<b>0.84</b>

Como se puede observar en los ácidos cumáricos el valor del primer  $pKa$  es mayor para el ácido  $p$ -cumárico, seguido del ácido  $o$ -cumárico y por último el ácido  $m$ -cumárico, este orden se invierte con el segundo valor de  $pKa$ .

El esquema D1 y E1 realizan una buena estimación para el ácido cafeico en el primer y el tercer valor de  $pKa$ , esto se ve reflejado en el error absoluto, el segundo valor de  $pKa$  calculado con estos esquemas difieren de 2 unidades con respecto al valor experimental.

#### 5.7.4 Estudio termodinámico

Se realizó un estudio termodinámico siguiendo la metodología la cual es referida como una evaluación basada en la química cuántica para la capacidad captadora de RL (QM-ORSA) [63].

La primera etapa de esta metodología consiste en investigar la viabilidad termodinámica de los diferentes caminos de reacción posibles. Los caminos de reacción que resultan ser exergónicos (valores de  $\Delta G < 0$ ) se toman en cuenta para los cálculos cinéticos.

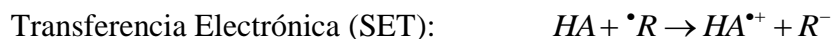
El estudio termodinámico se realizó en dos medios: medio polar (acuoso), a pH fisiológico, y medio no polar (lipídico). En ambos casos se estudiaron las reacciones con el radical  $\cdot\text{OOH}$ .

Se utilizó esta especie radicalaria dado que la metodología QM-ORSA propone el uso del radical. Las razones de la elección de este radical en esta metodología es que es el más simple de los radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) de moderada reactividad, se encuentra en sistemas biológicos de relevancia que puede ser efectivamente capturados para retardar el estrés oxidativo [64]. Esto es porque no tienen tiempo de vida media cortos, lo cual es requerido para la intercepción eficiente de compuestos fenólicos [65] u otros captadores.

Los radicales peroxilo están involucrados en la oxidación de lipoproteínas y membranas biológicas y han sido responsables del daño micro muscular [66].

En el particular caso de  $\text{ROO}\cdot$  se ha sugerido que es fundamental a los efectos secundarios de la respiración aerobia. Otra característica es que el radical  $\cdot\text{OOH}$  puede reaccionar por diferentes mecanismos de tales como HT, SET y formación del aducto radicalico (RAF).

Se estudiaron tres mecanismos de reacción con los RL ( $\cdot\text{R}$ )  $\text{HOO}\cdot$  en solución acuosa. Estos son:



León-Carmona y colaboradores [67] realizaron esta evaluación para el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico en medio acuoso y lipídico (pentiletanoato) con el radical  $\text{HOO}\cdot$ . Los

valores de  $\Delta G$  se muestran en la Tabla 13 en kcal/mol para los DAHC. Se observa que los valores de  $\Delta G$  negativos corresponden al sitio 8 del proceso RAF para los ácidos *p*-cumárico y cafeico en ambos medios.

El ácido cafeico muestra valores de  $\Delta G$  negativos con el mecanismo HT en ambos medios en los sitios 3 y 4, el ácido *p*-cumárico solo muestra un camino exergónico en medio acuoso para el anión.

El ácido *o*-cumárico muestra un camino exergónico con el proceso SET-2 al igual que el ácido cafeico.

Tabla 14. Energías de Gibbs (kcal/mol) para los DAHC en medio acuoso y en pentiletanoato con el radical HOO $\cdot$ .

Mecanismo	HCnm (II)	Cnm $\cdot$ (I)	H <sub>2</sub> ( <i>o</i> -Cmc) (II)	H( <i>o</i> -Cmc) $\cdot$ (I)	H <sub>2</sub> ( <i>m</i> -Cmc) (II)	H( <i>m</i> -Cmc) $\cdot$ (I)	H <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Cmc) (II)	H( <i>p</i> -Cmc) $\cdot$ (I)	H <sub>3</sub> Cf (II)	HCf (I)
SET-1		32.84		25.68		29.19		27.30		24.95
SET-2				-0.48		0.09		1.59		-0.05
<b>HT</b>										
Sitio 2			7.04	1.71						
Sitio 3					9.45	4.13			-4.27	-5.75
Sitio 4							0.12	-3.53	-6.24	-8.27
Sitio 9	32.91		31.41		33.64		37.90	37.69		
<b>RAF</b>										
8	0.87	-6.00	0.24	-6.87	1.45	-6.10	-0.29	-5.53	-0.73	-5.84

(I) medio acuoso, (II) pentiletanoato

### 5.7.5 Estudio cinético

Las constantes de velocidad se calcularon utilizando la teoría del estado de transición, tomando en cuenta todos los caminos de reacción. En la Tabla 15 se reportan estos valores y como las constantes de velocidad global ( $k_{\text{global}}$ ), a pH fisiológico.

Tabla 15. Constantes de velocidad totales y globales ( $M^{-1}s^{-1}$ ) para los DAHC en medio acuoso y en pentiletanoato con el radical HOO $\cdot$ .

Mecanismo	HCnm (II)	Cnm $\cdot$ (I)	H <sub>2</sub> ( <i>o</i> -Cmc) (II)	H( <i>o</i> -Cmc) $\cdot$ (I)	H <sub>2</sub> ( <i>m</i> -Cmc) (II)	H( <i>m</i> -Cmc) $\cdot$ (I)	H <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Cmc) (II)	H( <i>p</i> -Cmc) $\cdot$ (I)	H <sub>3</sub> Cf (II)	HCf (I)
SET-2				2.24x10 <sup>6</sup>		1.99x10 <sup>5</sup>		8.51x10 <sup>7</sup>		2.69x10 <sup>8</sup>
<b>HT</b>										
Sitio 2			6.34x10 <sup>4</sup>	1.45x10 <sup>6</sup>						
Sitio 3					1.29x10 <sup>4</sup>	1.19x10 <sup>5</sup>			2.53x10 <sup>4</sup>	1.51x10 <sup>4</sup>

Sitio 4							4.34x10 <sup>3</sup>	2.58x10 <sup>3</sup>	1.40x10 <sup>4</sup>	2.58x10 <sup>4</sup>
RAF										
Sitio 8	3.68x10 <sup>-2</sup>	1.64x10 <sup>2</sup>	3.07x10 <sup>-1</sup>	2.51x10 <sup>2</sup>	1.60x10 <sup>-1</sup>	1.41x10 <sup>2</sup>	8.25	5.17x10 <sup>2</sup>	7.36	2.57x10 <sup>3</sup>
<i>k</i> <sub>global</sub>	<b>3.68x10<sup>-2</sup></b>	<b>1.64x10<sup>2</sup></b>	<b>6.34x10<sup>4</sup></b>	<b>3.69x10<sup>6</sup></b>	<b>1.29x10<sup>4</sup></b>	<b>3.18x10<sup>5</sup></b>	<b>4.35x10<sup>3</sup></b>	<b>8.51x10<sup>7</sup></b>	<b>3.93x10<sup>4</sup></b>	<b>2.69x10<sup>8</sup></b>

(I) medio acuoso, (II) pentiletanoato

Los valores de las contantes globales fueron calculados como la suma de las constantes de cada camino de reacción tomando en cuenta las fracciones molares de las especies reactivas en el caso del medio acuoso. En la Tabla 16 se muestran los valores de *pKa* experimentales para los DAHC y se reportan las fracciones molares de cada especie a *pH* fisiológico.

Tabla 16. Fracciones molares de las especies de los DAHC a *pH*=7.4

DAHC	<i>pKa</i> <sub>1</sub>	<i>pKa</i> <sub>2</sub>	<i>pKa</i> <sub>3</sub>	<i>mf</i> (H <sub>3</sub> X)	<i>mf</i> (H <sub>2</sub> X <sup>-</sup> )	<i>mf</i> (HX <sup>2-</sup> )	<i>mf</i> (X <sup>3-</sup> )
H <sub>3</sub> Cf	4.547	6.046	11.399	-----	0.042	0.957	-----
H <sub>2</sub> ( <i>p</i> -Cmc)	4.687	9.397			0.002	0.988	0.010
H <sub>2</sub> ( <i>o</i> -Cmc)	4.550	9.517			0.002	0.989	0.010
H <sub>2</sub> ( <i>m</i> -Cmc)	4.282	9.707			0.001	0.994	0.005

En solución acuosa los procesos que resultaron ser más rápidos corresponden a la transferencia electrónica para los dianiones (SET-2). Por otra parte en pentiletanoato estos procesos no tienen lugar porque no producen la solvatación necesaria para la formación de intermediarios iónicos y los procesos más rápidos corresponden a los procesos HT para los ácidos cumáricos y cafeico y para el ácido t-cinámico el proceso RAF en el sitio 8.

De acuerdo a los valores de (*k*<sub>global</sub>) en solución acuosa el orden de reactividad de los compuestos estudiados con el radical <sup>•</sup>OOH es: H<sub>3</sub>Cf > H<sub>2</sub>(*p*-Cmc) > H<sub>2</sub>(*o*-Cmc) > H<sub>2</sub>(*m*-Cmc) > HCnm.

En medio lipídico el orden cambia a: H<sub>2</sub>(*o*-Cmc) > H<sub>3</sub>Cf > H<sub>2</sub>(*m*-Cmc) > H<sub>2</sub>(*p*-Cmc) > HCnm.

### 5.7.6 Valor relativo a Trolox

Se realizó una comparación entre las constantes de velocidad de los ácidos hidroxicinámicos y el valor de la constante de Trolox en medio acuoso y lipídico de acuerdo a la relación:

$$r^T = \frac{k_{global}}{k_{global}^{Trolox}} \quad (13)$$

En la Tabla 17 se reportan los valores de  $r^T$  en medio polar y no polar, tomando en cuenta que el valor de la constante en medio lipídico es de  $3.40 \times 10^3$  y en medio acuoso es de  $8.96 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Se observa que el valor de la constante de velocidad calculado para el ácido cafeico es mucho mayor al de los ácidos cumáricos esto se debe a la presencia de un grupo catecol en su estructura que al ser comparado con Trolox, este sólo posee en su estructura un OH fenólico.

La estructura de Trolox es similar a la de los ácidos cumáricos puesto que poseen un OH del ácido carboxílico y un OH fenólico, el valor de TEAC es mayor para estos compuestos dado que los ácidos cumáricos tienen un efecto en la conjugación de carácter electrofílico en la cadena lateral, en el caso de Trolox no hay esta cadena lateral que contenga enlaces pi.

Tabla 17. Valores relativos a Trolox en medio acuoso y lipídico con el radical  $\cdot\text{OOH}$

Relativo a Trolox	HCnm (II)	Cnm (I)	H <sub>2</sub> <i>o</i> Cmc (II)	HoCmc- (I)	H <sub>2</sub> <i>m</i> Cmc (II)	H <i>m</i> Cmc (I)	H <sub>2</sub> <i>p</i> Cmc (II)	H <i>p</i> Cmc- (I)	H <sub>2</sub> Cf (II)	HCf (I)
$r^T$	$1.08 \times 10^{-5}$	1.83	18.65	41.18	3.79	3.55	1.28	950	11.55	3002.23

De acuerdo a los valores relativos a Trolox el ácido cafeico y los ácidos cumáricos resultan ser eficientes como captadores de RL en medio acuoso con el radical  $\cdot\text{OOH}$  de la misma forma para medio lipídico.

# **CAPÍTULO 6.**

# **CONCLUSIONES**

## CAPITULO 6. CONCLUSIONES

Se determinaron las constantes de acidez en solución acuosa de los DAHC puesto que en este medio se llevan a cabo muchas reacciones químicas de los sistemas biológicos. Con los valores de  $pK_a$  se calculó la fracción molar de cada una de las especies de los DAHC a pH fisiológico para incluirlos dentro de los cálculos de la constante de velocidad.

Se determinó el valor de TEAC usando tres metodologías: la determinación amperométrica el ensayo con DPPH y la metodología QM-ORSA.

La capacidad antioxidante usando como estándar a Trolox con la detección amperométrica con biosensores de Lacasa y Tirosinasa además del ensayo con DPPH mostraron en las dos determinaciones la siguiente tendencia de acuerdo al valor de TEAC (de mayor a menor):  $H_3Cf > H_2(p-Cmc) > H_2(o-Cmc) > H_2(m-Cmc) > HCnm$ .

Se calcularon las constantes de velocidad teóricas en medio acuoso y lipídico tomando en cuenta los valores de las fracciones molares a pH fisiológico, observándose que el orden de la actividad antioxidante con el método QM-ORSA coincide con el orden del valor de TEAC obtenido con las determinaciones experimentales.

Además se calcularon las constantes de velocidad en pentiletanoato para imitar el ambiente lipídico obteniendo el siguiente orden:  $H_2(o-Cmc) > H_3Cf > H_2(m-Cmc) > H_2(p-Cmc) > HCnm$ .

Con base a los estudios experimentales y teóricos realizados en este trabajo se concluye que la posición del OH sobre el anillo aromático afecta en el valor de la capacidad captadora de RL y que en presencia de más grupos OH sustituidos en el anillo aromático, como el ácido cafeico, aumentará la reactividad y así la capacidad antioxidante.



# **CAPÍTULO 7. ANEXOS**

## CAPÍTULO 7. ANEXOS

### ANEXO A. Descripción del programa computacional SQUAD

SQUAD (Stability Quotients from Absorbance Data) es un programa creado por Legget, que está diseñado para calcular los mejores valores de las constantes de equilibrio de un modelo químico propuesto, a partir de datos de absorbancia a diferentes longitudes de onda, empleando el método de una relación no lineal de mínimos cuadrados.

Para cada valor de Absorbancia

$$A_{i,j} = \sum_l^J [species]_{i,j} * \epsilon_{j,k}$$

Donde  $[species]_{i,j}$  es la concentración de la  $j$ th especie en la  $i$ th solución (espectro),  $\epsilon_{j,k}$  es la absortividad molar de la  $j$ th especie y  $k$ th longitud de onda. Los cálculos de SQUAD en los valores de las constantes de formación globales, la cual minimiza, la suma de los cuadrados entre los valores de las absorbancias observadas y calculadas.

$$U = \sum_l^K \sum_t^I [A_{i,k}^{obs} - A_{i,k}^{cal}]^2$$

La desviación estándar de los datos de absorbancia proporcionan una medida global de como ajusta el modelo a los datos de absorbancia, si tienen valores de 0.001 a 0.004 quiere decir que es un buen ajuste mientras si resultan valores de 0.01 quiere decir que el ajuste entre el modelo y los datos de absorbancia son pobres.

Para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absortividad molar por especie, y determina la concentración de cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro difiere como máximo 0.001. Que el criterio anterior se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento de las constantes, debido a que se puede caer en el caso de una convergencia en un mínimo relativo.

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

- Parámetro de correlación (matriz)
- La desviación estándar sobre los datos de absorbancia ( $\sigma$  datos), y de las constantes ( $\sigma$  ctes.).
- La desviación estándar por espectro ( $\sigma$  espectro).
- La desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar ( $\sigma$  coef.)

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

## ANEXO B. Esquemas de reacción para el cálculo de valores de pKa

Existen diferentes técnicas experimentales que han sido aplicadas con éxito en la determinación de valores de pKa de manera confiable. Sin embargo a veces esto se convierte en un reto [68], por ejemplo, para intermediarios de vida corta y para ácidos o bases muy fuertes o muy débiles [69]. Es por ello que se han dedicado una gran cantidad de trabajos a obtener valores de pKa utilizando métodos teóricos [70,71]. Diferentes estrategias de cálculos y tendencias actuales han sido recientemente revisadas minuciosamente por Ho y Coote [72].

Los esquemas de reacción más comúnmente empleados hasta el momento para el equilibrio de deprotonación de un ácido hipotético HA, se conocen como esquema directo (A), esquema de intercambio protónico (D) y esquema cúmulo-continuo (E). En la aplicación de estos esquemas es importante recordar que los cálculos se realizan para estado estándar de 1atm y por tanto es necesario adicionar a los valores calculados en fase gas la corrección  $\Delta nRT \ln(\hat{R}T)$  para convertirlos a estado estándar 1M. En esta expresión los símbolos  $R$  y  $\hat{R}$  representan la constante de los gases en unidades de J/mol K y L atm/mol K, respectivamente. El esquema A es el usado más frecuente, probablemente debido a su simplicidad. Sin embargo incluye un protón y se sabe que los métodos de cálculo reproducen mal las energías de solvatación de esta especie en particular. Por lo tanto  $G_g(\text{H}^+)$  y  $G_{\text{solv}}(\text{H}^+)$  se obtuvieron a partir de los valores experimentales. Esto constituye la principal desventaja del uso de este esquema ya que los valores reportados experimentales para la energía libre de la solvatación del protón varían desde -259 hasta -264 Kcal/mol [80]. Esta variación es una importante fuente de error en el cálculo de valores de pKa, es decir, que sólo esta variación representa alrededor de 3 unidades de pKa. En este trabajo se ha utilizado  $G_g(\text{H}^+) = -4.39$  Kcal/mol y  $G_{\text{solv}}(\text{H}^+) = -265.89$  kcal/mol con base en la recomendación de Camaioni and Schwerdtfeger [73].

El esquema D, por el contrario, suele dar lugar a valores más fiables de pKa ya que el número y tipo de especies cargadas se conserva a ambos lados de la ecuación química. Este enfoque en particular se conoce como el método de intercambio protónico, el método isodésmico, o el método relativo para calcular valores de pKa. La principal desventaja de este enfoque es que su resultado depende en gran medida de la elección del ácido de

referencia ( $H_{Ref}$ ). Por lo tanto la calidad de los resultados depende de la similitud estructural entre  $H_{Ref}$  y  $H_A$ , y también de la exactitud del valor experimental de  $pK_a$  de  $H_{Ref}$ .

Desde el punto de vista teórico los esquemas A y D tienen el mismo inconveniente, que dependen directamente de datos experimentales. Esto debilita el carácter predictivo de una metodología de cálculo tanto para predecir valores de  $pK_a$  como para predecir cualquier otra propiedad química. Así los esquemas E y EN tienen la ventaja de ser independientes del experimento y al mismo tiempo conservar el número y tipo de especies cargadas a ambos lados del equilibrio. Las variaciones entre ellos (E1, E2, E3, EN1, EN2 y EN3) se diferencian en el número de moléculas de aguas explícitas y en la solvatación explícita de las diferentes especies involucradas en el equilibrio (ácido y base conjugada).

Hay que hacer notar que para los esquemas de reacción que incluyen moléculas de agua explícitamente es necesario hacer la corrección para el estado estándar del agua líquida, es decir 55.55 mol/L. De hecho se ha demostrado previamente que no tener en cuenta esta corrección lleva a errores sistemáticos [74, 75].

## Estudio teórico y experimental de las constantes de acidez del ácido *p*-cumárico (RESUMEN ENVIADO A CONGRESO DE LA SQM)

Alma K. Rivas-Sánchez, Annia Galano, María T. Ramírez-Silva

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Química, Área de Química Analítica, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México D.F. 09340, México. [zafiro\\_ak@hotmail.com](mailto:zafiro_ak@hotmail.com)

### I. Introducción

Las constantes de disociación ácida ( $K_a$ ) caracterizan la acidez de los compuestos y son comúnmente reportadas como valores de  $pK_a$ . Estos valores están relacionados con numerosas propiedades, tales como la solubilidad y la velocidad de absorción<sup>1</sup>, además de tener influencia sobre su reactividad. Por lo que su conocimiento es de suma importancia, así como para entender el comportamiento químico bajo diferentes condiciones. Además es importante predecir la forma en que se encontrarán en diferentes órganos, tejidos y fluidos del cuerpo humano<sup>2</sup>, dependiendo del pH. Existen diferentes técnicas experimentales que han sido aplicadas para la determinación experimental de los valores de  $pK_a$  de manera confiable; pero también se han dedicado gran cantidad de trabajos al cálculo de los mismos utilizando métodos teóricos<sup>3</sup>.

Los compuestos fenólicos son sustancias versátiles y están presentes en gran variedad de sistemas. Se ha identificado que cumplen con variadas funciones biológicas incluyendo la capacidad antioxidante, y propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antivirales. Ya que sus efectos varían en función de su  $pK_a$ , que regula las fracciones ácido-base bajo condiciones específicas, es de vital importancia conocer estos datos<sup>4-6</sup>. Entre ellos se encuentra el ácido *p*-cumárico (trans-4-hidroxicinámico (Figura 1). Estudios previos han demostrado que tiene propiedades antioxidantes<sup>7</sup>, además reduce el riesgo de cáncer de estómago<sup>8</sup>.

El ácido *p*-cumárico es de gran interés debido a sus propiedades quimiprotectoras y antioxidantes<sup>9</sup>. Se han reportado los valores de  $pK_a$  calculados teóricamente:  $pK_{a1} = 4.36$  y  $pK_{a2} = 8.98$ <sup>10</sup>. Sin embargo estos valores reportados fueron determinados en mezcla de metanol-agua por lo que en este trabajo se determinan en medio acuoso de forma experimental y teórica.

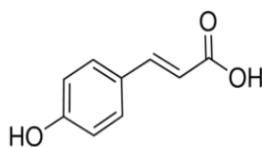


Figura 1. Estructura química del ácido *p*-cumárico

### II. Materiales y Métodos

#### II.1 Computacional

Se utilizó el paquete computacional Gaussian 09 para las optimizaciones de geometrías y los cálculos de frecuencia, utilizando el funcional M05-2X y el conjunto de funciones de base 6-311++G(d,p), en combinación con el modelo de solvente continuo SMD. En cuanto a los diferentes modelos computacionales utilizados para el cálculo de  $pK_a$ 's, se utilizaron algunos esquemas publicados por Ho y Coote<sup>11</sup>. La energía libre de Gibbs en fase acuosa para las reacciones de desprotonación a su vez se utiliza para calcular las constantes de acidez ( $K_a$ ).

#### II.2 Experimental

### Reactivos

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada 18 MΩ cm. Las disoluciones del ácido *p*-cumárico se realizaron con reactivo analítico Sigma (98.0 %) y metanol (grado cromatográfico Merck). Se trabajó con amortiguador Britton-Robinson preparado con ácido bórico (grado reactivo J.T.Baker), ácido fosfórico (grado reactivo J.T.Baker), ácido clorhídrico (Merck 1.19 g/ml, 37%) e hidróxido de sodio (Merck 99 %).

### Equipo

Se usó un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 20). El pH de las disoluciones fue ajustado empleando un pH-metro Mettler Toledo MP230.

### Sistema sin amortiguamiento

En una celda adaptada para mantener la temperatura a 25 °C se colocan 5 mL de HCl 0.1 M + 10 μL del ácido *p*-cumárico, a esta solución se le agrega NaOH 1 M con el ácido *p*-cumárico, con el fin de variar el pH en intervalos de aproximadamente 0.3 unidades. A cada medición de pH se le toma lectura del espectro de absorción.

### Sistema con amortiguamiento

Se prepara una serie de soluciones amortiguadoras Britton-Robinson 0.04 M en agua, las disoluciones se ajustan a diferentes valores de pH empleando NaOH 0.1M. A cada sistema amortiguado se le adiciona la misma cantidad de ácido *p*-cumárico, al mismo tiempo que se registra el espectro. Se registra el espectro del sistema sin ácido *p*-cumárico para tener el blanco del sistema.

Una vez obtenidos los espectros de absorción para cada sistema se utiliza el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez.

## III. Resultados y discusiones

### III.1 Orden de desprotonación

Se calcularon los posibles órdenes de desprotonación para el ácido *p*-cumárico. Se encontró que primero se desprotona el grupo carboxílico (9), y luego el HO<sup>•</sup> fenólico (figura 1), como era de esperarse. Este orden de desprotonación se estableció según las energías de Gibbs correspondientes (tabla 1).

Tabla 1. Energías libres de Gibbs estándar de desprotonación sucesivas (kcal/mol)

	Sitio	primera desprotonación	segunda desprotonación
<b>p-cumárico</b>	4	14.31	17.24
	9	7.3	

### III.2 Estimación teórica de los pKa's

Además se estimaron los pKa's con los esquemas de reacción A y D utilizando ácido butanoico como ácido de referencia y fenol.

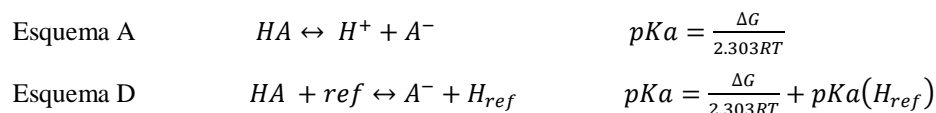


Tabla 2. Comparación de pKa's teóricos y experimentales con dos esquemas de reacción

Ácido	pKa's	pKa experimental	esquema A	esquema D
p-cumárico	pKa <sub>1</sub>	4.36	5.37	3.75
	pKa <sub>2</sub>	8.98	12.68	8.95

### III.3 Determinación de pKa's de forma experimental

Se obtuvieron los pKa's del ácido p-cumárico con ayuda del programa computacional SQUAD, (tabla 3). Se puede observar la constante con el sistema con amortiguamiento es de  $4.62 \pm 0.0027$ .

Tabla 3. Valores de pKa's para el sistema con y sin amortiguamiento

sistema	Concentración (M)	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
no amortiguado	6.35E-05	$4.69 \pm 0.0018$	$9.40 \pm 0.0009$
Amortiguado	6.37E-05	$4.62 \pm 0.0027$	$9.23 \pm 0.0011$

## IV. Conclusiones

Se determinó el orden de desprotonación observándose que la desprotonación es favorable para el OH del ácido carboxílico que corresponde al primer pKa del ácido p-cumárico y el OH fenólico corresponde al segundo valor de pKa. Se determinó los valores de pKa de manera teórica y experimental, concluyendo que el pKa obtenido con el sistema con amortiguamiento es el mejor, ya que el ajuste de espectros dados por SQUAD y los experimentales es de menor calidad con el sistema sin amortiguamiento. Para la estimación de pKa teórico el del esquema D da mejores resultados que el del esquema A.

## V. Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por el apoyo otorgado a través de la beca para estudios de Maestría, con número de becario 269183.

## VI. Bibliografía

- <sup>1</sup>Brown, T.N.; Mora-Diez, N.J. *Phys. Chem. B* 2006, 110, 9270.
- <sup>2</sup> Albert, A.; Serjeant, E. P. *The Determination of Ionization Constants*; Chapman and Hall: New York, 1984.
- <sup>3</sup> Pliego, J. R., Jr.; Riveros, J. M. *J. Phys. Chem. A* 2002, 106, 7434.
- <sup>4</sup> Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P.M.; Pridham, J.B. *Free Rad. Res.* 1995, 22, 375.
- <sup>5</sup> Renaud, S.; de Lorgeril, M. *Lancet* 1992, 339, 1523.
- <sup>6</sup> Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1460.
- <sup>7</sup> Halliwell, B., Ahluwalia, S. Hydroxylation of p-coumaric acid by horseradi peroxide the role of superoxide and hydroxyl radicals, *Biochem. J.*, 153 (1976), pp. 513–518
- <sup>8</sup> Zang, L.Y., Cosma, G., Gardner, H., Shi, X., Castranova, V., Vallyathan, V., Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 279 (2000), pp. 954–960.
- <sup>9</sup> Torres, J., & Rosazza, J. P. N. (2001). Microbial transformations of p-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of Natural Products*.
- <sup>10</sup> Beltrán, J.L., Sanli N., G. Fonrodona, D. Barrón, G. O' zkan, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 253.
- <sup>11</sup> Ho, J. Coote M. L., *Theor. Chem. Acc.* (2010), 125, 3–21.





# SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

extiende la presente

## Constancia

A:

Ingeniero Químico, Alma Karina Rivas Sánchez, Dra. Annia Galano Jiménez, Dra. María Teresa Ramírez Silva.

Por el trabajo:

“Estudio teórico y experimental de la constante de acidez del ácido p-cumárico”

que presentaron en el marco de las actividades científicas del

48° CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA  
32° CONGRESO NACIONAL DE EDUCACIÓN QUÍMICA  
celebrados en Guanajuato, Gto., 31 de agosto al 4 de septiembre, 2013.

Dr. Benjamín Velasco Bejarano  
Presidente de Congresos

Dr. Juvenio Robles García  
Presidente del Comité Organizador Local

# REFERENCIAS

## 8. REFERENCIAS

- [1] Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1990). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science*, 90, 7915–7922.
- [2] Swanson, C. (1998). Vegetables, fruits, and cancer risk: The role of phytochemicals. In W. R. Bidlack, S. T. Omaye, M. S. Meskin, & D. Jahmer (Eds.), *Phytochemicals: A new paradigm*, 1–12. Lancaster, PA: Technomic Publishing.
- [3] Halliwell B. Antioxidants in human health and disease, (1996). *Annu Rev Nutrition*, 16, 33-50.
- [4] Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insight*, 31, 1–4.
- [5] Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M., (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews* 13, 79–106.
- [6] Breinholt, V., (1999). Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. In: Kumpulainen, J., Salonen, J.E. (Eds.), *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 93–105.
- [7] Shahidi, F., Naczk, M., (1995). *Food Phenolics*. Technomic Publishing Co, Lancaster, Basel.
- [8] Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols *J. Science. Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- [9] Sroka, Z., Cisowski, W., (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids *Food Chem. Toxicol.*, 41, 753–758.
- [10] Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., (2011). Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chemistry*, 127, 169–173.
- [11] Pereira, O.R., Silva, A.M.S., Domingues, M.R.M., Cardoso, S.M., (2012). Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food Chemistry*, 131, 652–659.
- [12] Shahidi, F., Naczk, M., (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications* Technomic Publishing Co, Lancaster, Basel.
- [13] Clifford, M., (1999). Review chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362–372.
- [14] Herrmann, K., (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 28, 315–347.

- [15] Amorati, R., Pedulli, G., Cabrini, L., Zambonin, L., Landi, L. (2006). Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids, *J. Agric. Food Chem*, 54(8), 2932-2937
- [16] Cheng, J., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z., (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 104, 132-139.
- [17] Kim, H., Lee, D., Lee, S., Seong, A., Gin, D., Hwang, J., Park, J., (2010) Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid, *International Immunopharmacology*, 10, 1242-124.
- [18] Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., and Williamson, G. (2011) Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm., *Food Composition and Analysis*, 24, 148-153.
- [19] McGuffin, M., Hobbs, C., Upton, R., Goldberg A., (Eds.) (1997). *American Herbal Products Association's Botanical Safety Hand-Book*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, *J. Agric. Food Chem*. 53, 7749–7759.
- [20] Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., Nerin, C., (2005). Solid and vapor-phase antimicrobial activities of sex essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains, *J. Agric. Food Chem*. 53, 6939–6946.
- [21] Dugoua, J.J., Seely, D., Perri, D., Cooley, K., Forelli, T., Mills, E., Koren, G., (2007). From type 2 diabetes to antioxidant activity: a systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark, *Can. J. Physiology Pharmacology* 85, 837–847
- [22] Dinkova-Kostova, A., Abeygunawardana, C., and Talalay, P. (1998). Chemoprotective properties of phenylpropeinoids, bis(benzyl)ation of potencies as phase 2 enzyme inducer and radical scavengers *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 5287-5296.
- [23] Torres and Torres, J.L., and Rosazza, J.P.N (2001). Reactions of *p*-coumaric acid with nitrite: Product isolation and mechanism studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1486-1492.
- [24] Sondheimer, E., (1958). On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 74 (1), 131-138.
- [25] Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hiroe, K., Akiyama, K, Taniguchi, H., (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (7), 2161-2168.

- [26] Catelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G.P., Pridham, J., Sampson, J., Rice-Evans, C., (1985). Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters* 368 (1), 188-192.
- [27] Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H., (1997). Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta* 1335 (3), 335-342.
- [28] Gulcin, I., (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217 (2-3), 213-220.
- [29] Kim, S.R., Kim, Y.C., (2000). Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochemistry* 54 (5), 503-509.
- [30] Riccardi, D., Schaefer, P., Cui, Q. (2005). pKa calculations in solution and proteins with QM/MM free energy perturbation simulations: a quantitative test of QM/MM protocols. *J. Phys. Chem. B*, 109, 17715–17733.
- [31] Brown, T. N.; Mora-Diez, N. Determination of Aqueous pKa values of Protonated Benzimidazoles (2006). *J. Phys. Chem. B*, 110, 9270-9279.
- [32] Ho, J., Coote L., (2010). A universal approach for continuum solvent pKa calculations: are we there yet?. *Theor. Chem.*, 125, 3-21.
- [33] Safavi, A., Abdollahi, H., (2001). Thermodynamic characterization of weak association equilibria accompanied with spectral overlapping by a SVD-based chemometric method, *Talanta*, 53, 1001-1007.
- [34] Legget, D.J., (1995). *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York.
- [35] Gaussian 09, Revision A.08, 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, Millam, N. J., Klene, M. Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, O., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J., Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2009).

- [36] Berenguer V., Santiago, J., (2003). Manual de química de las disoluciones, 2<sup>da</sup> edición, Ed. Club Universitario, 65-68.
- [37] Cheeseman KH, Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman KH, Slater TF, editors. Free radicals in medicine. London (UK): Churchill Livingstone, 481-493.
- [38] Laure. L., (2013). Theoretical design of new very potent free radical scavenger. Computational and Theoretical Chemistry, 1009, 108-114.
- [39] Narros A. Mar de la Fuente M. (2006) Experimentación en química, Aspectos teóricos de espectroscopía de absorción UV-Vis, Ed. Paraninfo, 139-141.
- [40] Willard, H.H., Merritt, L.L., Dean, J.A., Settle, F.A., (1998). Instrumental Methods of Analysis, Wadsworth, Belmont.
- [41] Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92(2), 235–254.
- [42] Wright J; Johnson, E. Predicting the activity of phenolic antioxidant., (2001). Theoretical method, analysis of substituent effects, an application to major families of antioxidants, Journal of the American Chemical Society, 123, 6, 1173-1183.
- [43] Londoño, J., (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad, Ed. Corporación Universitaria Lasallista, 129-157.
- [44] Brand-Williams W., M. E. Cuvelier, C. Berset., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology. 28, 1, 25-30.
- [45] Ibarra P., Determinación del contenido fenólicos en extractos naturales mediante sensores enzimáticos. Tesis, UAM-I.
- [46] Huang, D. Ou, B., Ronald L., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.
- [47] Kamal-Eldin A. and Appelqvist A., *Lipids*, (1996), **31**, 671–701.
- [48] Hogg, S. Lohmann H. and Russell, E., *Can. J. Chem.*, (1961), **39**, 1588–1594.
- [49] Friaa D. (2006). Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH<sup>·</sup> in semi-aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.*, 4, 2417-2423.
- [50] Clarck L, Lyons, C., (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29-45.

- [51] Thévenot, DR., Toth, K., Durst, R., Wilson, G. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Anal. Lett.* 34,636-659.
- [52] Eggins B., (1996). *Biosensors: an introduction*, Wiley-Teubner.
- [53] Galano A., Álvarez-Diduk R., Ramírez-Silva M. T., Alarcón A. G., Rojas-Hernández A., (2009). Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chemical Physics*, 363, 13-23.
- [54] Galano A., Alvarez-Idaboy J. R., (2009). Guanosine + OH radical reaction in aqueous solution: a reinterpretation of the UV-Vis data based on thermodynamic and kinetic calculations. *Org. Lett.*, 11(22), 5114-5117.
- [55] Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. (2009). What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on Electron Transfer Reactions between carotenoids and free radicals, *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 12113-12120.
- [56] Galano A, Vargas R., Martínez A. (2010) . Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion, *Chem. Phys.*, 12, 193-200.
- [57] Zhao, Y., Schultz, N. E., Truhlar. D. G. *J. Chem. Theory Comput.* (2006), Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions, 2, 364-382.
- [58] (a) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. (2009). Guanosine + OH radical reaction in aqueous solution: A reinterpretation of the UV-Vis data based on thermodynamic and kinetic, *Org. Lett.*, 11, 5114. (b) Zavala-Oseguera, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Merino, G.; Galano, A. (2009), *J. Phys. Chem. A*, 113, 13913. (c) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. (2009). *J. Phys. Org. Chem.* 22, 971
- [59] Eyring, H. (1935), The Activated Complex in Chemical Reactions *J. Chem. Phys.* 3, 107-115.
- [60] Marcus, R. A. (1997). Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment, *Pure Appl. Chem.*, 69, 13-29.
- [61] Rebollar M., Galano, A., (2011). Searching for Computational Strategies to Accurately Predict pKas of Large Phenolic Derivatives *J. Chem. Theory Comput.* 7 (8),2528–2538
- [62] Hans R. C. *Química General*. Ed. Reverte, (1997), vol. 1, pag. 188.
- [63] Galano A., Alvarez-Idaboy J., (2013). A computational methodology for accurate predictions of rate constants in solutions; Application to the assessment of primary antioxidant activity, *computational chemistry* (2013), 34:24-30.

- [64] Terpin, P. and Abramovic, H. (2010). A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids, *Food Chem.*, 121, 366-371.
- [65] Sies, H. *Exp. Physiol.* (1997), 82, 291.
- [66] Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T. Iseki, K. (2009), *Food Chem.*, 114, 466.
- [67] León-Carmona J.R., Alvarez-Idaboy J.R., Galano A. (2012). On the peroxy scavenging activity of hydroxycinnamic acid derivatives: mechanisms, kinetics and importance of the acid-base equilibrium. *Phys. Chem.*, 14, 12534-12543.
- [68] Albert, A. Serjeant, E. (1994). *The Determination of Ionization Constants*; Chapman and Hall: New York.
- [69] Pliego, J., Riveros, J. (2002). Theoretical calculation of pKa using the cluster-continuum model, *J. Phys. Chem. A*, 106, 7434-7439
- [70] Toth, A., Liptak, M., Phillips, L., Shields, G., (2001). Accurate relative pKa calculations using complete basis set Gaussian models combined with continuum solvation methods, *J. Chem. Phys.*, 114, 4595-4606
- [71] Schuurmann, G. Cossi, M., Barone, V., Tomasi, J. (1998), Prediction of pKa of carboxylic acids using the ab-initio continuum-solvation model PCM-UAHF., *J. Phys. Chem. A*, 102, 6706-6712
- [72] Ho, J., Coote, M., (2009), pKa calculation of some biologically important carbon acids an assessment of contemporary theoretical procedures, *J. Chem. Theory Comput.* 5, 295-306
- [73] Camaioni, D., Schwerdtfeger, C., (2005), Accurate experimental values for the free energies of hydration of H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup> and H<sub>3</sub>O, *J. Phys. Chem. A* 109, 10795-10797.
- [74] Pliego, J., (2003), Thermodynamic cycles and the calculation of pKa, *Chem. Phys. Lett.* 367, 145-149.
- [75] Bryantsev, V. S., Diallo, M., Goddard, W., (2008). Calculation of solvation free energies of charged solutes using mixed cluster/ continuum models, *J. Phys. Chem. B*, 112, 9709-9719.