INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



SISTEMA APRÓTICO PARA EL ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE POLIFENOLES: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE VS CONDUCTA ELECTROQUÍMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN QUE ES REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

POR NETZAHUALCÓYOTL ARROYO CURRÁS

MONTERREY, N.L.

SISTEMA APRÓTICO PARA EL ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE POLIFENOLES: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ν S CONDUCTA ELECTROQUÍMICA

POR NETZAHUALCÓYOTL ARROYO CURRÁS

	aprobado: bre, 2008
Comité l	Evaluador:
	nando Videa Vargas sesor
Quim. Silvia Ponce López	Lic. Blanca Esthela Rodríguez Esparza
Sinodal	Sinodal
Dra. Laura Eugenia Romero Robles	Dr. Juan Manuel Peralta Hernández
Sinodal	Sinodal
Dr. Marcelo Fern	ando Videa Vargas
Director de la	Carrera de LCQ
Dr. Omar Y	ague Murillo
Director del Depar	rtamento de Química

Ni por un instante dejar de renacer -nuestraslas inmensas sensaciones.

P.D. El éxodo es sólo una geografía en la imaginación.

Postal desde Groningen, emil santos Utrecht, 2009

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos químicos cuya capacidad de estabilizar electrones desapareados por resonancia les confiere una particular actividad antioxidante. Estas substancias son de interés científico debido a su potencial reductor, a su abundancia en la dieta humana y a su posible capacidad de prevenir enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Existen diversos protocolos para evaluar la actividad y la capacidad antioxidante de estas moléculas. Los directos, estudian sus características electrónicas en función del pH, la concentración de especies u otras variables, como el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Los indirectos, son aquellos orientados a medir su poder secuestrador de radicales, como la prueba ORAC ("Oxygen-Radical Absorbance Capacity"). Sin embargo, la información obtenida a partir de éstos suele ser ambigua o poco reproducible cuando se cambian las condiciones experimentales, por lo que es imperante revisar nuevas metodologías que generen información química útil para una correcta determinación del carácter antioxidante de estas substancias.

Comprender la conducta redox de las antocianinas, los flavonoles y otras especies polifenólicas, requiere de análisis que den razones energéticas, electrónicas y estructurales. Diferentes grupos de investigación han partido de la premisa anterior con intenciones de encontrar relaciones funcionales entre la reactividad química y el efecto de los sustituyentes en la estructura de los polifenoles, dejando evidencia de que los parámetros electroquímicos son buenos indicadores de la capacidad antioxidante de estas moléculas, sin consolidar sus resultados en alguna tabla comparativa.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo realizó un análisis electroquímico de tres flavonoles (*kaempferol, quercetina y miricetina*), tres antocianidinas (*cianidina, delfinidina y pelargonidina*) y tres antocianinas (*delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido*), cuyas estructuras sólo difieren en la posición y cantidad de grupos hidroxilo en su anillo B (variando así su grado de oxidación). Los resultados obtenidos permiten relacionar sus parámetros electroquímicos con su estructura y su capacidad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Marcelo Videa y a Luz María Martínez por su humanismo, por respaldarme en mi necesidad creativa y por ser a todo dar. A Elsa Guajardo, por su apoyo instructivo; a Porfirio Caballero, por compartir aventuras químicas e incursionar conmigo el Centro de Biotecnología; y a Ernesto Mariño, por su amistad, que es un estímulo de vida científica. Todos ellos personas maravillosas, no doctores.

A Jorge Moreno, mi amigo "el Doc", y a su cátedra de investigación por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este proyecto de tesis. A José Rodríguez, por su paciencia durante mis análisis instrumentales y por nuestras charlas filosóficas. A Janet Gutiérrez, por su gentileza y sus hijas antocianinas: aquellos pedazos de tesis doctoral que compartió conmigo.

Agradezco también a Carlos Jiménez, mi guía químico-computacional; a Diego Crespo, mi maestro boliviano y pelón bíblico de cabecera; a Gabriela López de Lara, mi compañera de reflexiones íntimas; a Juan Andrés Martínez, mi hermano "pernocto"; a Marlene Mora, por su constante ir y venir de la Carreta y su sonrisa matutina; a Mixtli Campos, por ser campeón mundial en acelerar nuestras emociones y un excelente matemático; y a Salvador Gerardo, por sus asesorías electroquímicas.

Finalmente, agradezco con particular cariño a Antelia de la Fuente, por acompañarme en clase el día de luz en que me enamoré de la química, y por compartir conmigo la trayectoria industrial del Silicio, que hace computadoras y otras curiosidades lúdicas.

Je remercie à Bernard Micheli pour m'enseigner que la chimie est simple, si simple que nous pouvons jouer avec elle. Merci pour votre spontanéité.

¡ La química es divertida!

Al amor y su entropía...



Índice de contenidos

Lista de fig	uras	ix
Lista de tal	blas	xi
Capítulo 1:	Introducción	13
1.1. Ac	tividad Antioxidante	13
1.1.1.	La hipótesis de los antioxidantes	15
1.2. Po	lifenoles	16
1.2.1.	Características estructurales de los flavonoides	17
1.2.2.	Capacidad antioxidante de antocianinas, antocianidinas y flavonoles	18
1.3. Co	onducta electroquímica de flavonoides	21
1.3.1.	Descripción electrónica-estructural de flavonoides	22
1.3.2.	Estudio de flavonoides con Voltamperometría Cíclica	26
1.3.3.	Estudio de flavonoides con Voltamperometría de Onda Cuadrada	29
1.4. Ob	ojetivos	32
Capítulo 2:	Desarrollo Experimental	33
2.1. Pro	eparativos	33
2.1.1.	Celda electroquímica para el estudio de polifenoles	33
2.1.2.	Medio aprótico	34
2.1.3.	Sales de soporte para medio aprótico	35
2.1.4.	Construcción de electrodos	36
2.2. Pro	eparación de muestras	38
2.2.1.	Extracción y purificación de antocianinas	38
2.2.2.	Disoluciones y tratamiento del electrodo de trabajo $old W$	41
2.3. Té	cnicas experimentales	42
2.3.1.	Potenciometría	42

2.3.2.	Compensación IR	43
2.3.3. Voltamperometría Cíclica		44
2.3.4.	Voltamperometría de Onda Cuadrada	45
Capítulo 3:	Discusión de Resultados	47
3.1. Est	abilización del sistema aprótico	47
3.1.1.	Selección del electrodo de referencia	47
3.1.2.	Efecto de la purificación del disolvente	50
3.1.3.	Efecto de la Compensación IR	52
3.1.4.	Sistema aprótico final	54
3.2. Par	rámetros electroquímicos de flavonoides	56
3.2.1.	Análisis voltamperométrico de flavonoles	56
3.2.2.	Análisis voltamperométrico de antocianidinas	62
3.2.3.	Estructura molecular y electrónica, E° ' y actividad antioxidante	65
3.3. Ca	racterización por voltamperometría de onda cuadrada	74
Rihligrafía		78

Lista de figuras

Figura 1. Generación de radicales libres durante la respiración aerobia	13
Figura 2. Radicales libres y enfermedad.	14
Figura 3. La estructura básica de un flavonoide.	18
Figura 4. Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox.	20
Figura 5. Oxidación electroquímica de quercetina.	21
Figura 6. Vías de neutralización de radicales libres.	22
Figura 7. Voltamperograma cíclico de 1mM Ác. Cafeico	28
Figura 8. Voltamperogramas cíclicos de quercetina en disolución.	29
Figura 9. Señal de excitación típica en un experimento de <i>VOC</i>	30
Figura 10. Voltamperometrías de onda cuadrada de quercetina.	31
Figura 11. Dibujo esquemático de la celda electroquímica empleada	34
Figura 12. Tetrafluoroborato de tetraetilamonio	35
Figura 13. Electrodos.	37
Figura 14. Celda electroquímica	38
Figura 15. Espectro de absorbancia UV-Visible del extracto butanólico	39
Figura 16. Diagrama de circuito de un potenciostato convencional.	42
Figura 17. Voltamperogramas cíclicos de TFBTEA y AgNO ₃ en acetonitrilo	48
Figura 18. Voltamperogramas cíclicos	49
Figura 19. Voltamperograma cíclico de disolución madre	50

Figura 20. Voltamperogramas cíclicos de Fc 1mM en disolución matriz	51
Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de Fc 0.5mM.	51
Figura 22. Representación esquemática de un programa de potencial	52
Figura 23. Voltamperogramas cíclicos de Fc en acetonitrilo purificado	53
Figura 24. Voltamperogramas de Fc 0.2mM a diferentes velocidades	55
Figura 25. Linearizaciones de <i>Randles</i> .	55
Figura 26. Flavonoles, antocianidinas, antocianinas, flavanol y flavona	57
Figura 27. Voltamperogramas cíclicos de kaempferol.	58
Figura 28. Mecanismo de la oxidación electroquímica del kaempferol.	58
Figura 29. Voltamperograma de onda cuadrada de kaempferol	59
Figura 30. Voltamperogramas cíclicos de quercetina	60
Figura 31. Voltamperograma de quercetina en disolución matriz.	61
Figura 32. Voltamperogramas cíclicos de miricetina	61
Figura 33. Voltamperogramas cíclicos de cloruro de pelargonidina	63
Figuras 34. Voltamperogramas cíclicos de cloruro de cianidina	64
Figura 35. Voltamperogramas de onda cuadrada de antocianidinas	65
Figura 36. Sitios de unión a complejos metálicos.	66
Figura 37. Correlación entre E° ' y el número de sustituyentes	67
Figura 38. Relaciones lineales entre E° ' y equivalentes reducidos de Fe3+ y Cu2+	68
Figura 39. Voltamperogramas de onda cuadrada de flavonoides	68

Figura 4	0. Voltamperograma de onda cuadrada del esqueleto de flavona6	9
Figura 4	1. Efecto de las insaturaciones en el anillo C sobre la capacidad antioxidante7	'C
Figura 4	2. Voltamperometrías de onda cuadrada de los glucósidos de delfinidina	1
Figura 4	3. Voltamperogramas de onda cuadrada típicos del extracto crudo	15

Lista de tablas

Tabla 1. Efecto de la ingesta cotidiana de antioxidantes en la incidencia de cáncer	15
Tabla 2. Principales clases de polifenoles.	16
Tabla 3. Protocolos usados para determinar la capacidad antioxidante	19
Tabla 4. Valores de IC50 en términos de secuestro de radical peroxinitrito	23
Tabla 5. Constantes relativas de formación de complejo Fe ²⁺ /(Fe ²⁺ –c. fenólico)	24
Tabla 6. Conclusiones mecánico-cuánticas importantes.	26
Tabla 7. Metodología de separación por Cromatografía de Partición Centríguga	40
Tabla 8. Condiciones para la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.	41
Tabla 9. Parámetros utilizados en Compensación IR.	43
Tabla 10. Parámetros utilizados en VC	45
Tabla 11. Parámetros utilizados en VOC	45
Tabla 12. Parámetros electroquímicos determinados para cada flavonol	62
Tabla 13. Parámetros electroquímicos determinados para cada antocianidina	63
Tabla 14. Jerarquización de flavonoides en función de su E° .	73

Capítulo 1: Introducción

1.1. Actividad Antioxidante

El término oxidación se refiere a la transferencia de electrones de una especie química a otra, proceso que obedece la siguiente ecuación:

$$R^n = O^{n^+} + ne^-$$

Las reacciones de oxidación son una parte esencial de nuestro metabolismo, pues el oxígeno molecular que respiramos actúa como último aceptor de electrones durante la generación de energía en forma de ATP [1]. Sin embargo, alteraciones en el equilibrio químico del organismo promueven la transferencia de electrones desapareados, que reducen sólo parcialmente al oxígeno y generan radicales libres (ver **Figura 1**) [2].

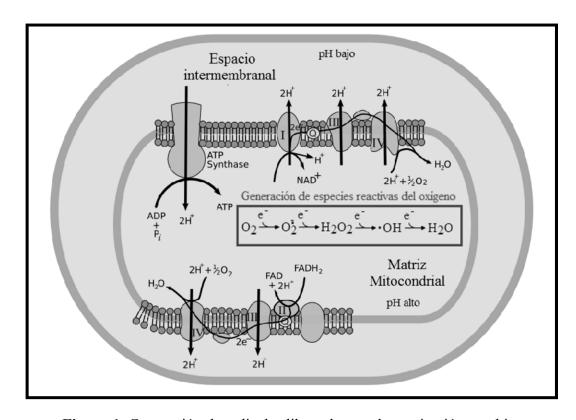


Figura 1. Generación de radicales libres durante la respiración aerobia. Editado de referencias [3] y [4].

Los radicales libres son especies sumamente reactivas (con vidas medias del orden de 10^{-9} s) y atacan moléculas adyacentes a su sitio de aparición donando, abstrayendo o incluso compartiendo sus electrones del orbital más externo [5]. Esto no solamente

transforma la estructura de las moléculas con las que interactúan, sino que además ocasiona la aparición de otras especies reactivas del oxígeno (*ROS*, por sus siglas en Inglés), generando reacciones moleculares en cadena que amplifican su poder oxidativo [6].

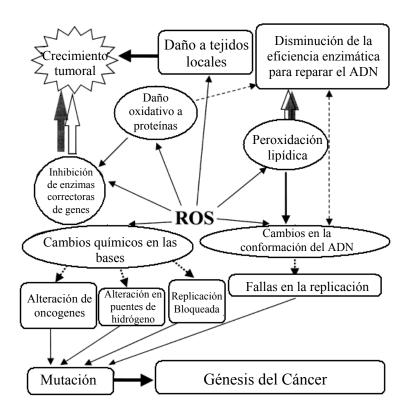


Figura 2. Radicales libres y enfermedad. En condiciones normales, las células del organismo humano son capaces de neutralizar las *ROS*; sin embargo, cuando éstas se acumulan en altas concentraciones, ocurren cambios en las macromoléculas y el ambiente celular, que pueden ocasionar la génesis del cáncer. Como se observa en la figura, una modificación química del ADN altera la especificidad de sus puentes de hidrógeno y disminuye la exactitud de la ADN polimerasa encargada de la replicación genética.

Editado de referencia [7].

Un antioxidante es toda substancia que, cuando está presente en baja concentración relativa a un substrato oxidable, retrasa o disminuye significativamente su oxidación, sea esta ocasionada por *ROS* o no [8]. La actividad antioxidante, por otro lado, corresponde a la constante de velocidad de una reacción entre un antioxidante puro y un radical libre determinado; y fue descrita por primera vez para compuestos con importancia biológica en los trabajos experimentales de Paul György y Rudolph Tomarelli (1943) [9], que

estudiaron extractos acuosos de arroz blanco, avena y maíz en modelos de oxidación con ácido linoléico.

1.1.1. La hipótesis de los antioxidantes

Si bien las *ROS* cumplen funciones inmunológicas y de señalización química en el organismo, su sobreproducción ocasionada por estados patológicos (aunada a fallas en los mecanismos naturales de defensa), daña biomoléculas primordiales como el ADN, lípidos y proteínas [10]. Este daño se ha asociado con el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer [11] (ver **Figura 2**).

La hipótesis de los antioxidantes sugiere que, si estos compuestos pueden detener reacciones de oxidación *in vitro*, un aumento en su ingesta cotidiana debe reducir entonces el riesgo de contraer enfermedades crónicas que estén relacionadas con procesos de oxidación biológica [12], como las mencionadas en el párrafo anterior.

Tabla 1. Estudios epidemiológicos: efecto de la ingesta cotidiana de antioxidantes en la incidencia de cáncer. Un riesgo relativo <1 indica un efecto positivo en la salud.

Incertidumbre de ± .01.

Editado de referencia [13].

Tipo de estudio y n de la muestra	Clase de flavonoides analizada	flavonoides Años de Ubicación del		Riesgo Relativo	Ref.
Cohorte					
<i>n</i> = 34,651 mujeres	Catequinas	13	Se revisaron todos los órganos	0.97 1	
n=549	Catequinas	13	Bronquios y pulmones	0.94	
n=728 hombres	Catequinas	10	Pulmones	0.92	15
<i>n</i> = 9,959 hombres	9,959 hombres Flavonoles y flavonas 20		Se revisaron todos los órganos	0.87	16
Caso-control					
n=1,164 mujeres 582 casos/582 controles	Flavonoles y flavanonas		Pulmones	0.8	17
n=309 mujeres 103 casos/ 206 controles	Flavonoles	Pulmones		0.98	18

Tabla 2. Principales clases de polifenoles. La letra C significa ciclo. Así, C₆ representa un ciclo de seis carbonos.

Editado de referencia [19].

No. de átomos de carbono	Esqueleto Básico	Clase	Ejemplos
6	C6	Fenoles, benzoquinonas	Catecol, Hidroquinona, 2,6-dimetoxybenzoquinona
7	C6-C1	Ácidos fenólicos	Gálico, Salicílico
8	C6-C2	Acetofenonas, derivados de la tirosina, ácidos fenilacéticos	3-Acetil-6 metoxibenzaldehído, tirosol, Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
9	C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, coumarinas	Caféico, Ferúlico, Miristicina, Eugenol, Umbelliferona, etc.
10	C6-C4	Naftoquinonas	Juglona, Plumbagina
13	C6-C1-C6	Xantonas	Mangiferina
14	C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas	Resveratrol, Emodina
15	C6-C3-C6	Flavonoides, isoflavonoides	Quercetina, Cyanidina, Genisteína
18	$(C6-C3)_2$	Lignanos, neolignanos	Pinoresinol, Eusiderina
30	$(C6-C3-C6)_2$	Biflavonoides	Amentoflavona
n	(C6-C3) _n	Ligninas	
	(C6-C3-C6) _n	Flavolanos (taninos condensados)	

Así, revisiones recientes de la literatura en las principales revistas arbitradas de nutrición, demuestran que los polifenoles son autores convincentes de ciertas mejoras en el tratamiento del cáncer (**Tabla 1**) [20,21]. Estos compuestos antioxidantes constituyen una de las principales familias de metabolitos secundarios y son responsables de las características organolépticas de los alimentos vegetales, como su color y sabor [22].

1.2. Polifenoles

Los compuestos fenólicos son un grupo de moléculas bien distribuidas en el reino vegetal, con más de 8,000 estructuras conocidas hasta el momento. La palabra "polifenoles" define un rango considerable de substancias poseedoras de anillos

aromáticos con uno o más sustituyentes hidroxilo [23], cuya estructura varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos polimerizados, como los taninos [24]. Las principales clases de polifenoles aparecen enlistadas en la **Tabla 2**, de acuerdo con el número de átomos de carbono que componen su esqueleto.

Entre las clases de polifenoles descritas en la **Tabla 2**, los flavonoides son los más abundantes en la dieta humana (ingesta diaria promedio para la población de EUA: 1020–1070 mg/ día) [25,26], y están considerados como antioxidantes con gran actividad biológica [27,28]. Bendini et al. publicaron en 2007 una revisión de la literatura científica relacionada con estos compuestos, donde se concluye que el interés general en ellos, aparte de lo ya mencionado, proviene también de su habilidad para modular la actividad de enzimas y de sus aplicaciones como suplementos alimenticios [29].

Cada flavonoide presenta una diferente actividad antioxidante en ensayos *in vitro*, y ésta puede relacionarse con su estructura química [30]. Para comprender la conexión entre su presencia en los alimentos y su posible efecto terapéutico en el organismo humano, es necesario revisar entonces sus características estructurales [31,32].

1.2.1. Características estructurales de los flavonoides

La estructura básica de los flavonoides consiste de tres anillos fenólicos: A, B y C. El benceno A está condensado con un ciclo de tres miembros (C), que a su vez se encuentra sustituido en la posición 2 por un fenil benceno (B), como se muestra en la **Figura 3** a). Las moléculas cuyo heterociclo C es un pirano pertenecen a la subclase de flavanoles y antocianidinas, mientras que aquellas con anillo de pirona forman la subclase de flavonoles, flavonas y flavanonas [33].

Los flavonoles y las antocianinas (glucósidos de antocianidinas), son las subclases de flavonoides encontradas con mayor frecuencia en la naturaleza [34,35] y, debido a que están presentes en concentraciones significativas dentro de los alimentos (hasta 423µg de flavonol por g de tubérculo, por ejemplo) [36,37], se han convertido en el motivo de diversas investigaciones científicas y de este trabajo de tesis en particular.

En los flavonoles, el ciclo C corresponde a un anillo de pirona sustituido con un grupo hidroxilo en la posición orto respecto al carbonilo; mientras que en las antocianidinas, corresponde a un anillo de pirano sustituido con el mismo grupo en la posición meta respecto del oxígeno. Las estructuras de ambas subclases de polifenoles aparecen en la **Figura 3** b) [38]. Los flavonoles considerados en este estudio son: *miricetina, quercetina y kaempferol*; las antocianidinas: *delfinidina, cianidina y pelargonidina*; y las antocianinas: *petunidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido*. Los tres grupos de compuestos difieren entre sí en el número de sustituyentes o el tipo de sustituyentes incorporados a su anillo B. Estas moléculas son de interés científico debido a su notable capacidad antioxidante.

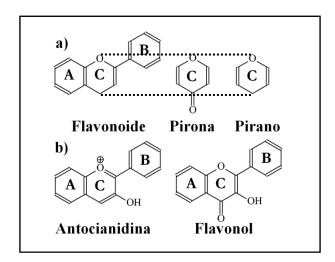


Figura 3. *a)* La estructura básica de un flavonoide. *b)* Los flavonoles y las antocianidinas comparten un sustituyente hidroxilo en la posición 3 del heterociclo C. Tanto el *kaempferol, la quercetina y la miricetina*, como la *pelargonidina, cianidina y delfinidina* poseen uno, dos y tres sustituyentes hidroxilo en el anillo B respectivamente.

1.2.2. Capacidad antioxidante de antocianinas, antocianidinas y flavonoles

La capacidad antioxidante es una medida de la cantidad de moles de un cierto radical que pueden ser neutralizados por una mezcla de compuestos en disolución, independientemente de la actividad antioxidante individual de cada uno en su estado puro [39]. Los métodos empleados con mayor frecuencia para determinar esta capacidad pueden dividirse en dos grupos generales: el de ensayos directos, que se basan en la reacción de transferencia de un solo electrón (monitoreados a través de cambios

colorimétricos adscritos a la reducción de la especie oxidante); y el de indirectos, que se fundamentan en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno, donde el antioxidante y un control compiten para reducir a las especies radicales [40]. Ambos métodos aparecen ejemplificados en la **Tabla 3**.

Pese a la gran diversidad existente de protocolos disponibles para evaluar la capacidad antioxidante de los flavonoides, ninguno es aplicable a un grupo amplio de estos compuestos y, al mismo tiempo, insensible al tipo de matriz biológica en que se encuentran [41]. Prueba de lo anterior es el artículo publicado por Tabart et al. en 2009, donde la determinación de la capacidad antioxidante de varios flavonoides fue diferente para los métodos TEAC, DPPH y ORAC. Los resultados de tal trabajo correspondientes a los flavonoles y las antocianidinas estudiados en este proyecto aparecen condensados en la **Figura 4**.

Tabla 3. Protocolos usados con mayor frecuencia para determinar la capacidad antioxidante de disoluciones *in Vitro*.

Editado de referencia [42].

Ensayos relacionados con reacciones de transferencia de hidrógeno:	Indirectos (siglas en Inglés):		
	ORAC (capacidad de absorbancia del radical oxígeno).		
	TRAP (parámetro de captura total de radicales).		
$ROO \cdot +AH \rightarrow ROOH + A \cdot$	CBA (ensayo de blanqueamiento Crocin).		
	IOU (absorción inhibida de oxígeno).		
	Inhibición de la oxidación de ácido linoleico.		
	Inhibición de la oxidación de LDL.		
Ensayos relacionados con reacciones de transferencia de electrones:	Directos (siglas en Inglés):		
	TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes Trolox).		
	FRAP (parámetro de reducción del ión fierro).		
$M(n) + e (de AH) \rightarrow AH \cdot +M(n-1)$	DPPH (difenil-1-picrilhidrazil).		
	Capacidad de reducción del Cobre.		
	Fenoles totales con reactivo de Folin-Ciocalteu.		

Como la capacidad y la actividad antioxidantes de los flavonoides provienen de su naturaleza redox, la electroquímica debe ser una alternativa útil para comprender mejor las características electrónicas y estructurales que rigen el poder reductor de estas moléculas [43,44]. Además, la selectividad de las técnicas electroanalíticas hace posible dilucidar el contenido total de compuestos polifenólicos presentes en diversos sistemas *in vitro* [45,46]. Haciendo caso a tales observaciones, este trabajo se concentró en el estudio de los flavonoides ya mencionados, con el empleo de las técnicas electroquímicas que se explicarán en apartados posteriores.

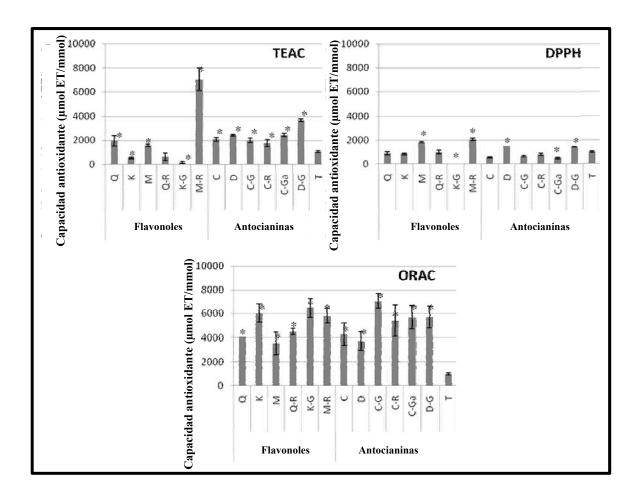


Figura 4. Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (mol ET/mmol de flavonoide), determinada por métodos TEAC, DPPH y ORAC. El asterisco indica una diferencia significativa respecto a Trolox, definida por técnica ANOVA (p<0.05). Nomenclatura: quercetina (Q), kaempferol (K), miricetina (M), rutina (Q-R), kaempferol-3-O-glucósido (K-G), miricetina-3-ramnósido (M-R), cianidina (C), delfinidina (D), cianidina-3-O-glucósido (C-G), cianidina-3-O-rutinósido (C-R), cianidina-3-O-galactósido (C-Ga), delfinidina-3-O-glucósido (D-G), Trolox (T). Editado de referencia [47].

1.3. Conducta electroquímica de flavonoides

La reducción de una especie radical por un flavonoide ocurre gracias a que el segundo dona un átomo de hidrógeno o más al radical libre:

El radical **H**[•] proviene del rompimiento de enlaces O-H presentes en su estructura y la velocidad de homólisis depende de las características electrónicas de cada molécula. Este proceso se desarrolla de manera similar durante una oxidación electroquímica, hecho que permite relacionar la facilidad de oxidar una molécula con su capacidad para secuestrar radicales [48] (**Figura 5**).

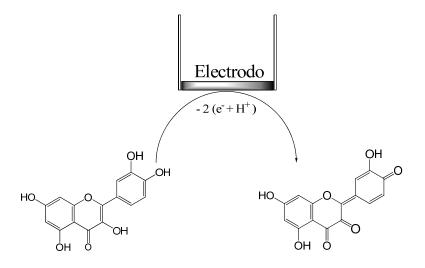


Figura 5. Oxidación electroquímica de quercetina. La reacción que ocurre en la superficie de un electrodo es idéntica a la que ocurre entre esta misma molécula y un radical libre.

Un paso previo a la investigación electroquímica de flavonoles, antocianidans y antocianinas involucra necesariamente la descripción precisa de sus niveles energéticos HOMO / LUMO, y de su estructura electrónica.

1.3.1. Descripción electrónica-estructural de flavonoides

Para facilitar la determinación de los parámetros electroquímicos que modulan el comportamiento antioxidante de los flavonoides, se puede concentrar su análisis en dos escenarios concretos (ver **Figura 6**) [49]:

- a) la acción capturadora de electrones durante las etapas de iniciación o propagación de la oxidación, y:
- b) la acción como agentes "quelantes" de metales iónicos.

Figura 6. Dos vías en que los compuestos fenólicos pueden neutralizar radicales libres: *izquierda*, captura y estabilización de electrones desapareados; *derecha*, "*quelación*" de metales iónicos.

Editado de referencia [49].

Para el escenario a), Heijnan et al. (2001) han demostrado que la captura de peroxinitritos con flavonoles es favorecida por la presencia de sustituyentes hidroxilo en la estructura de los flavonoles, y por las interacciones electrónicas que estos sustituyentes tienen entre sí. El protón del OH ubicado en la posición R³ del *kaempferol*, por ejemplo, es especialmente ácido gracias a la estabilización del anión oxígeno generada por los hidroxilos que se encuentran en las posiciones R⁵ y R⁵ del esqueleto flavonoide [50]. Las conclusiones de este grupo de investigación aparecen resumidas en la **Tabla 4**.

El término IC_{50} se refiere a la concentración necesaria de un antioxidante para neutralizar el 50% de los equivalentes radicales existentes dentro de una disolución. En la **Tabla 4**, el *kaempferol* presenta la IC_{50} más pequeña, lo que significa que es el mejor reductor de radicales peroxinitrito de entre los compuestos de la lista, pues necesita estar presente en baja concentración para neutralizar el 50% de las especies radicales disueltas.

Tabla 4. Valores de IC50 en términos de secuestro de radical peroxinitrito (valor promedio ± D.E., n=3-6) de algunos flavonoides. La abreviación Bz=bencilo. Editado de referencia [58].

$$R^7$$
 A
 C
 R^3
 $R^{4'}$
 $R^{3'}$

Compuesto	\mathbb{R}^3	R ⁵	\mathbb{R}^7	$\mathbb{R}^{3'}$	$\mathbb{R}^{4'}$	IC ₅₀ (μM)
3 hidroxiflavona	ОН	Н	Н	Н	Н	>200
5 hidroxiflavona	Н	ОН	Н	Н	Н	>300
7 hidroxiflavona	Н	Н	ОН	Н	Н	>300
Kaempferol	ОН	OH	ОН	Н	OH	0.35 ± 0.05
Crisina	Н	ОН	ОН	Н	Н	295±26
Galangina	ОН	ОН	ОН	H	H	1.02 ± 0.11

Para el escenario b), Andjelkovic' et al. (2006) corroboraron que la actividad "quelante" de los polifenoles es proporcional al número de fragmentos catecol presentes en su estructura, a través de relaciones lineales entre el metal libre y su contraparte acomplejada [51]. También, vincularon el cambio de color en la disolución con el $\Delta \mathbf{o}$ determinado por espectrometría de UV-Visible.

Si el equilibrio de un ión metálico ligado a un antioxidante se establece como:

k antioxidante + ión metálico \rightleftharpoons antioxidante-ión metálico

las constantes de asociación (ó enlace) para los complejos formados con antioxidantes pueden describirse de la siguiente manera:

$$K = \frac{[antioxidante-i\acute{o}n\ met\acute{a}lico]}{[antioxidante][i\acute{o}n\ met\acute{a}lico]}$$

Así, los resultados numéricos de Andjelkovic' et al. condensados en la **Tabla 5** aparecen como constantes de formación del complejo (k).

Estas constantes se calculan experimentalmente graficando 1/[ión metálico acomplejado] contra 1/[ión metálico libre], y dividiendo el intercepto de la curva lineal obtenida entre su pendiente [52]. En la **Tabla 5**, el ácido clorogénico es la molécula con mayor número de unidades catecol y, como predicho, posee la constante de enlace más elevada con el ión Fe²⁺. El EDTA es un competidor del antioxidante (con una constante de enlace grande), y se incluye en el sistema como parámetro de comparación.

Tabla 5. Constantes relativas de formación de complejo Fe²⁺/(Fe²⁺–compuesto fenólico) en presencia de 0 a 1 mM EDTA. [Fe²⁺]= 0.0005 M. Incertidumbre= 0.15mM. Editado de referencia [59].

Compuesto fenólico	Estructura Constante relativa de formación de complejo en EDTA:			
		0 mM	0.01 mM	1 mM
Ácido protocatechuico	ОН	1.81	1.18	0.25
Hidroxitirosol	OH OH	2.66	2.00	1.10
Ácido Gálico	но	4.78	4.54	0.51
Ácido Clorogénico	HO OH OH	20.13	12.00	2.95

Con los resultados anteriores en mente, algunos grupos de investigación han concentrado el análisis electrónico de los flavonoides en aquellos fragmentos específicos de su estructura que producen la actividad antioxidante: como la donación electrónica de los hidroxilos en las posiciones R³, R⁵ y R⁷ del ciclo AC y los sustituyentes hidroxilo en el ciclo B [58]. Para ello, es necesario considerar cálculos teóricos computacionales que sólo se describirán superficialmente en este documento.

La Teoría del Funcional de la Densidad (*DFT*, por sus siglas en Inglés) permite correlacionar el comportamiento eléctrico de un flavonoide con su estructura electrónica y molecular, y estudiar fragmentos específicos de ésta. La *DFT* es una aproximación cuántica computacional (un cálculo matemático complejo), que establece que todas las propiedades basales de un sistema electrónico son una función de su densidad electrónica [53].

La densidad electrónica de un átomo o molécula se refiere a la probabilidad de encontrar un electrón en un punto definido del espacio molecular. Es una cantidad escalar determinada numéricamente normalizando la función de onda Ψ para un sistema con N electrones. Los cálculos DFT pueden realizarse empleando diferentes **funcionales** (funciones matemáticas que toman un vector como argumento y regresan un escalar).

Los funcionales suelen nombrarse con siglas que identifican el nombre de los científicos que los proponen y los supuestos que implican. B3LYP, por ejemplo, significa Becke-3-Parameter/Lee-Yang-Parr (funcional de 3 parámetros de Becke, con correcciones realizadas por Lee, Yang y Parr).

Algunas de las conclusiones mecánico-cuánticas más importantes sobre el efecto de la estructura electrónica en la actividad antioxidante de flavonoides, obtenidas con el empleo de la *DFT* u otros modelos cuánticos, aparecen en la **Tabla 6**. La información expuesta en esta tabla concuerda con los resultados experimentales obtenidos por Heijnan, Andjelkovic´ y sus respectivos grupos de investigación. Este trabajo de tesis comparará esos resultados con parámetros electroquímicos medidos a través de técnicas voltamperométricas, cuyos fundamentos teóricos se exponen en el siguiente apartado.

Tabla 6. Conclusiones mecánico-cuánticas importantes sobre la actividad de algunos flavonoides. **Nomenclatura:** AM1 (Modelo de Austin 1), DFT (Teoría Funcional de Densidad).

Flavonoides estudiados	Conclusión	Teoría y funcional	Autores
pelargonidina, cianidina, delfinidina y aurantinidina	Las moléculas son planas. Hidroxilo en posición 6 incrementa la mínima energía de excitación. Más sustituciones la disminuyen.	DFT/B3LYP/D95	Sakata et al. [54]
flavonas	Moléculas planas.	DFT/B3LYP	Meyer, M. [55]
Apigenina, luteolina y taxifolina.	Flavonoides con ciclo B orto- dihidroxi sustituido poseen los protones más ácidos.	DFT/B3LYP/6- 311++G**	Leopoldini et al. [56]
quercetina	Los centros activos son catecol en el anillo B; OH en R³ muy ácido, donación electrónica sobre éste por hidroxilos en R⁵ y R⁵.	AM1	Heijnen et al. [57]
quercetina	En C ₂ yace la mayor probabilidad de encontrar radical.	AM1	Russo et al. [58]
quercetina, luteolina, catequina y taxifolina.	Deslocalización π indispensable para estabilización de radical.	DFT/B3LYP/6-31++G**, DFT/B3LYP/6-31(+)G*	Antonczak, Serge [59]

1.3.2. Estudio de flavonoides con Voltamperometría Cíclica

Trabajos de investigación como los de Born et al. (1994) [60] y Markovic' [61] et al. (1996) sugieren a la *Voltamperometría Cíclica* (*VC*) como una técnica útil en la primera aproximación a la evaluación del comportamiento redox de los flavonoides, pues permite observar la respuesta de estos compuestos a señales electroquímicas definidas experimentalmente.

En VC, el potencial de un electrodo de trabajo es barrido linealmente (contra un electrodo de referencia), de un potencial inicial hasta otro final y luego de regreso, lo que da como resultado una gráfica de corriente en función del potencial aplicado. Esta

corriente es medida a través de un contraelectrodo (que generalmente es una malla de platino).

La **Figura 7** muestra un voltamperograma cíclico de ácido cafeico. Si el potencial es barrido hacia potenciales más positivos, el electrodo de trabajo se polariza lo suficiente como para oxidar al ácido, lo que da origen a un pico de corriente anódica (*Ia*) que perdura hasta que el ácido cafeico se agota en la superficie del electrodo. En 700 mV aproximadamente, la dirección de barrido se invierte, dando origen a un pico de corriente catódica (*Ic*) que corresponde a la reducción del ácido.

Los picos de corriente, *Ia ó Ic*, para un sistema electroquímicamente reversible (rápido transporte de electrones en la superfície del electrodo) son descritos por la ecuación de *Randles-Sevcik*:

$$I/A = 2.69 \times 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot [A] \cdot C \cdot \sqrt{D \cdot v} \quad (ec. 1)$$

donde *I* es el pico de corriente en amperios, n el número de electrones transferidos, A el área superficial del electrodo en centímetros cuadrados, D el coeficiente de difusión en centímetros cuadrados por segundo, C la concentración en moles por metro cúbico y *v* la velocidad de barrido en volts por segundo [62]. La **ec. 1** permite emplear a la *VC* como técnica analítica para determinar los coeficientes de difusión de las especies en estudio y su concentración presente en disolución.

Por otro lado, para una reacción redox con producto estable como la que se ilustra en la **Figura 7**, la igualdad Ia/Ic = 1 se cumple, independientemente de la velocidad de barrido del potencial. Cualquier desviación considerable de 1 indica reacciones acopladas al proceso de óxido-reducción. Esta relación es un parámetro electroquímico importante para descubrir si el comportamiento redox de los flavonoles, las antocianidinas y las antocianinas genera productos secundarios, y cómo la presencia de éstos afecta al sistema en estudio [63].

La **Figura 7** muestra también los potenciales Ec y Ea, que corresponden al potencial marcado en el eje de las abscisas donde ocurren los procesos catódico y anódico respectivamente. La diferencia entre estos dos potenciales, ΔE , cuando los procesos de

oxidación y reducción de un flavonoide son reversibles, indica el número de electrones transferidos al electrodo, *n*, durante su reacción. Esto se expresa matemáticamente como:

$$Ea - Ec = 0.059/n$$
 V ec. 2

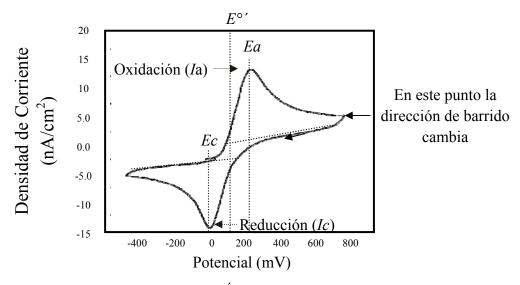


Figura 7. Voltamperograma cíclico de 1mM Ác. Cafeico en 70mM Amortiguador fosfato (*p*H=7.4)/EtOH 1:1 (v/v). Electrodo de trabajo: carbón vítreo, E. de referencia: Ag/AgCl/3M KCl; E. auxiliar: carbón vítreo; velocidad de barrido: 100mV/s. Editado de referencia [63].

Además, en la imagen se encuentra el potencial redox formal $(E^{\circ'})$ ubicado entre Ea y Ec. Éste se calcula con la ecuación: $E^{\circ'} = (Ea + Ec)/2$ (ec. 3) y es un parámetro electroquímico único de cada flavonoide.

Ana M. O. Brett y Mariana E. Ghica (2003) usaron la VC para estudiar la oxidación electroquímica del flavonol quercetina [64]. Sus voltamperogramas serán empleados como referencia en esta investigación y aparecen en la **Figura 8**.

El inciso a) en la **Figura 8** corrobora que los procesos de transferencia de electrones en flavonoides son complejos, pues presentan diferentes pasos de oxidación (4 sugeridos para la quercetina, por ejemplo, indicados en la figura con números 1, 2, 3 y 4).

El inciso b), por su parte, muestra una clara reversibilidad del pico 1 cuando el barrido de potencial es invertido antes de la segunda oxidación, como se muestra en la figura con

líneas punteadas. Sin embargo, los picos 2, 3 y 4 no son reversibles. Esto puede sugerir que la segunda oxidación de la quercetina involucra un cambio estructural considerable, como una fragmentación, ó una reacción química posterior asociada a ese proceso oxidativo. Finalmente, el inciso c) indica una fuerte dependencia redox con el pH, entendida en la **Figura 8** por el desplazamiento lateral de los potenciales de oxidación y el cambio en la morfología del voltamperograma correspondiente a cada pH.

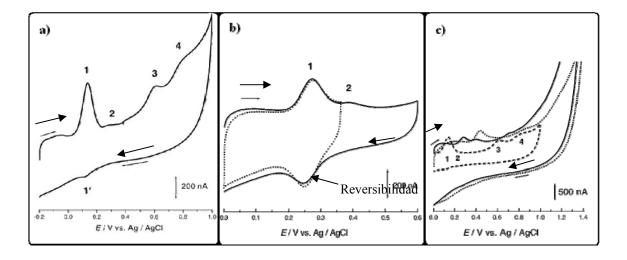


Figura 8. Voltamperogramas cíclicos de quercetina en disolución. *a)* 10^{-5} M de quercetina en amortiguador fosfato con pH=7.7 (v.b.=50mV/s). *b)* 10^{-5} M de quercetina en amortiguador fosfato con pH=5.5 (—) barrido entre 0.0 y +0.6 mV, (---) barrido entre 0.0 y +0.35 mV (v.b.=50mV/s). *c)* 10^{-5} M de quercetina en amortiguador fosfato (···) con pH=3.5, (---) con pH=5.5 y (—) con pH=7.7 (v.b.=100mV/s). Editado de referencia [64].

Otras conclusiones de Ana M. O. Brett y Mariana E. Ghica no ilustradas declaran que los flavonoides se adsorben en la superficie del electrodo de trabajo y que el producto final no es electroactivo, por lo que bloquea su superficie e impide nuevas determinaciones ("pasivación" del electrodo). Además, corroboraron la influencia de la desprotonación del grupo catecol en la capacidad de estos compuestos para donar electrones y en su actividad antioxidante.

1.3.3. Estudio de flavonoides con Voltamperometría de Onda Cuadrada

La *Voltamperometria de Onda Cuadrada (VOC)* es también un método electroquímico útil para el análisis de pares redox orgánicos, como son los flavonoides. A diferencia de la

VC, la VOC es una técnica de pulsos en la que el barrido de potencial sigue una programación escalonada que se caracteriza por ajustes en la altura ó amplitud de los pulsos y la frecuencia entre mediciones.

La **Figura 9** presenta un esquema de la señal de excitación típica en un experimento de VOC. El potencial de inicio, E_{st} , es la media de los potenciales encontrados en cada extremo de la onda cuadrada. La magnitud de los pulsos, E_{sw} , es un medio de la amplitud de pico a pico de cada señal; su duración es ½ τ , donde τ es el periodo que duran un pulso positivo y uno negativo juntos; la frecuencia es $1/\tau$ y el incremento de potencial, ΔE , corresponde a la altura de cada onda. Tanto la corriente I_f como la I_b son medidas durante los últimos microsegundos de cada pulso, y la respuesta final del experimento es registrada como el cambio de corriente neto: $\Delta I = I_f - I_b$. La interpretación cualitativa se obtiene graficando ΔI en función de E_{sw} [81].

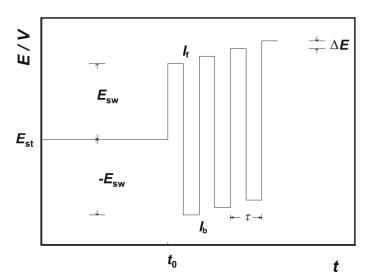


Figura 9. Señal de excitación típica en un experimento de VOC. E_{st} , potencial de inicio; E_{sw} , altura de pulso; ΔE , altura de pico; τ , periodo de onda; t_0 , tiempo de acumulación de especies reactivas en la superficie del electrodo; I_f e I_b , corrientes positiva y negativa medidas. Extraído de referencia [65].

Una de las principales ventajas de la *VOC* radica en la posibilidad de observar durante una corrida experimental si la reacción de transferencia electrónica es reversible o no. Como la corriente es muestreada tanto en los pulsos positivos como en los negativos, los picos que corresponden a la oxidación o a la reducción de las especies electroactivas en la

superficie del electrodo pueden ser obtenidos simultáneamente. La **Figura 10** muestra un ejemplo de este punto.

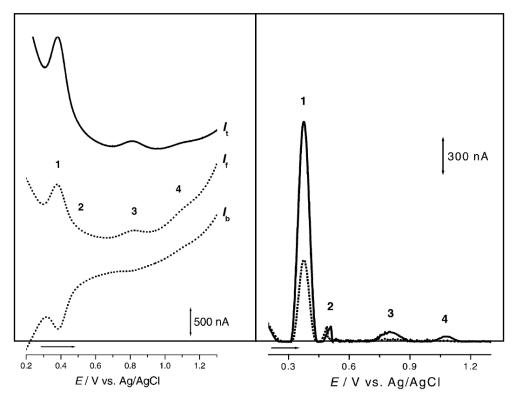


Figura 10. Voltamperometrías de onda cuadrada de una disolución 0.1M de quercetina amortiguada en pH=4.1. Derecha: representación diferencial ($\Delta I=I_f-I_b$). Izquierda: corrientes medidas en las direcciones positiva y negativa respectivamente. f=50Hz, $\Delta E=50$ mV. Extraído de referencia [64].

Si se comparan las curvas I_f e I_b en la imagen de la *izquierda* es posible notar que tanto el proceso 1 como el proceso 3 son reversibles, pues sus picos de oxidación y de reducción correspondientes están presentes en cada curva. Esta información es complementaria con la imagen de la *derecha*, que nos presenta el resultado diferencial ΔI $vs E_{sw}$.

Como último punto, es importante mencionar que existe una relación directa entre los experimentos VC y VOC. Por un lado, los picos diferenciales obtenidos en una voltamperometría de onda cuadrada corresponden al potencial redox formal (E°) calculable en voltamperometría cíclica, característica útil para corroborar resultados. Por otro lado, las velocidades de barrido efectivas de cada experimento pueden igualarse,

pues existe la siguiente proporcionalidad: $SR = f(Hz) \times \Delta E(mV)$, donde SR es velocidad de barrido en voltamperometría cíclica (scan rate, SR, por sus siglas en Inglés) [66].

Ahora bien, a partir de la información expuesta en la **Figura 4**, la **Tabla 6**, y los antecedentes teóricos sobre las técnicas voltamperométricas *VC y VOC*, se desprende la motivación de este proyecto de tesis, fundamentada en los siguientes puntos:

Primero, que las revisiones más recientes de la literatura científica en relación con la actividad y la capacidad antioxidantes de los flavonoides, particularmente los flavonoles y las antocianidinas, reclaman la generación de más información química, estructural y electrónica sobre estos compuestos.

Segundo, que no existe en la actualidad ninguna ecuación que, tras la inclusión de parámetros termodinámicos y cinéticos, permita comparar efectivamente la actividad antioxidante de un flavonoide con otro; y

Tercero, que los estudios existentes sobre estructuras de antocianidinas y flavonoles no han analizado a fondo el efecto de sustituyentes en su comportamiento redox.

1.4. Objetivos

Estudiar el efecto de los sustituyentes en el anillo B de los flavonoides *kaempferol*, *quercetina*, *miricetina*; *cloruros de delfinidina*, *cianidina y pelargonidina*; *petunidina-3-glucósido*, *delfinidina-3-glucósido* y *malvidina-3-glucósido*, sobre el potencial formal y el número de procesos redox utilizando técnicas voltamperométricas en disoluciones no acuosas de acetonitrilo.

Encontrar relaciones estructurales y electrónicas que permitan proponer parámetros útiles para la jerarquización de los flavonoides de acuerdo con su poder antioxidante.

Evaluar la aplicabilidad del sistema construido para la presente investigación en la caracterización de flavonoides posterior a la realización de separaciones cromatográficas.

Capítulo 2: Desarrollo Experimental

Un reto experimental importante para el estudio de compuestos fenólicos con técnicas voltamperométricas radica en la construcción de sistemas electroanalíticos que permitan, al mismo tiempo, trabajar con cantidades reducidas de analito (pues algunos flavonoides son excesivamente costosos) y estabilizar los radicales formados durante la oxidación de estas moléculas bajo condiciones anhidras (para lograr repetitividad). El presente trabajo de tesis propone un sistema que se adapta a tales consideraciones. Éste será explicado en los siguientes apartados.

2.1. Preparativos

Los preparativos necesarios para el análisis electroquímico de polifenoles involucran al menos las siguientes etapas: diseño y disposición de una celda electroquímica; selección del disolvente, selección de las sales de soporte y elaboración de los electrodos de trabajo, referencia y contador (si no se dispone de equivalentes comerciales).

2.1.1. Celda electroquímica para el estudio de polifenoles

Las mediciones experimentales fueron realizadas en una celda electroquímica adaptada a partir de un arreglo sugerido por Scholz [62]. Como puede observarse en la **Figura 11**, la celda incluye un matraz de dos cabezas en forma de pera (**Quark Glass**) con capacidad máxima de 10mL, dos tapones de poli[tetrafluoroetileno] (**Sigma Aldrich**) perforados y un par de tubos capilares de vidrio (**CTR Scientific**).

Las perforaciones de cada tapón, tres en el del centro y dos en el de la derecha, se hicieron a la medida de los tubos capilares y de los electrodos de trabajo, referencia y contador con ayuda de un taladro vertical. Esto permitió que cada electrodo estuviera perfectamente fijo en su respectivo tapón, evitando así errores en las mediciones (los experimentos son sensibles al movimiento de los electrodos).

El tubo capilar del tapón derecho fue conectado a un tanque de nitrógeno (**Praxair**, 99% pureza), con el que se mantuvo una atmósfera libre de humedad y oxígeno durante todos los experimentos. El flujo de gas inerte fue controlado con el manómetro del tanque

y colocando un dedo índice en la punta del capilar de salida ubicado en el tapón central. En la imagen, **R** corresponde al electrodo de referencia, **C** al contraelectrodo y **W** al electrodo de trabajo.

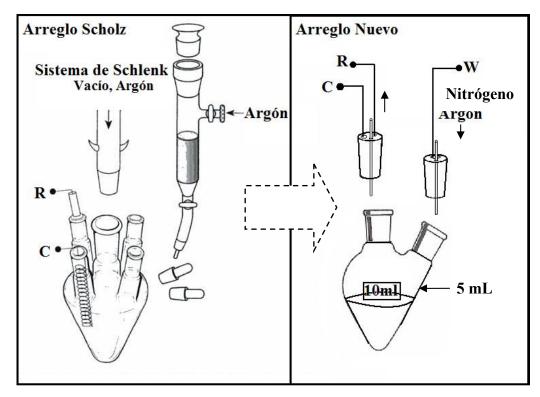


Figura 11. Dibujo esquemático de la celda electroquímica empleada. *Izquierda:* arreglo sugerido por Scholz. *Derecha:* arreglo adaptado a partir del sistema de Scholz. Editado de referencia [62].

2.1.2. Medio aprótico

Si bien los flavonoides analizados en este trabajo ocurren en la naturaleza dentro de sistemas acuosos, estudiarlos en disolventes apróticos (que no contienen protones ácidos), como el acetonitrilo (MeCN), brinda la posibilidad de evaluar su comportamiento redox escapando, entre comillas, de otras variables importantes como el *p*H. Además, el MeCN favorece la solubilidad de los analitos orgánicos y simplifica su conducta electroquímica, evitando o al menos disminuyendo el número de reacciones acopladas a la etapa de transferencia de electrones hacia el electrodo de trabajo [67].

En esta investigación, el acetonitrilo (**Sigma Aldrich**, anhidro, 99.8% pureza) fue purificado y secado de la siguiente manera: 1500mL fueron colocados en un matraz bola

de 2000mL. A ese volumen se agregaron 5g de hidruro de sodio (**Sigma Aldrich**, anhidro), y la mezcla se sometió a reflujo con agitación por una hora, luego de la cual se colectó el 80% del volumen inicial (descartando 10% del principio y 10% del final del destilado). **Nota:** la adición de NaH al MeCN generó liberación de hidrógeno y burbujeo intenso. Los 1200mL recuperados se recolocaron en el matraz de 2000mL limpio y seco, y fueron mezclados con 5g de pentóxido de fósforo (**Fluka**, anhidro). La mezcla anaranjada se sometió a reflujo durante dos horas (agitación importante), al cabo de las cuales se recuperó, nuevamente, el 80% del volumen original (en el matraz de reflujo se formó un polímero color anaranjado intenso).

Como último paso, los 960mL recuperados se vaciaron en un matraz de 1500mL, se mezclaron con 5g de hidruro de calcio (**Sigma Aldrich**, anhidro) y se sometieron a reflujo de dos horas, tras las cuales se recuperó, una vez más, el 80% del destilado. El volumen final obtenido de MeCN seco y puro fue de 768mL, mismos que se almacenaron en un frasco ámbar protegido del sol y a temperatura ambiente. El protocolo de purificación fue adaptado de la referencia [68].

2.1.3. Sales de soporte para medio aprótico

El número de sales disponibles para su uso como electrolitos de soporte en disolventes orgánicos es particularmente pequeño, tomando en cuenta la cantidad total de sales existentes en la naturaleza. Esto se debe a que los disolventes orgánicos no son considerados buenos ionizadores de sales y, por lo tanto, las sales solubles en ellos deben poseer mucho carácter orgánico para ser útiles [69], obedeciendo la regla: "lo mismo disuelve a lo mismo."

$$\begin{bmatrix} C_2H_5 & C_2H_5 \\ C_2H_5 & C_2H_5 \end{bmatrix}^+ \begin{bmatrix} F & F \\ F & F \end{bmatrix}$$

Figura 12. Tetrafluoroborato de tetraetilamonio. Como puede observarse, el catión posee carácter orgánico, lo que permite su ionización del complejo aniónico.

En el presente trabajo se seleccionó como electrolito de soporte al tetrafluoroborato de tetraetilamonio (TFBTEA, **Sigma Aldrich**, 99.9% pureza), debido a su buena solubilidad

en acetonitrilo y a su débil reactividad electroreductiva. Un diagrama de los complejos aniónico y catiónico que componen al TFBTEA se presenta en la **Figura 12**.

2.1.4. Construcción de electrodos

Las técnicas voltamperométricas modernas requieren la participación de tres electrodos durante los experimentos. El potenciostato es el dispositivo encargado de polarizar los electrodos y de realizar los programas de barrido o de pulsos de potencial. Una explicación simplificada sobre su funcionamiento se brindará más adelante, dejando este apartado exclusivamente para la descripción de los electrodos.

El electrodo de trabajo **W** utilizado a lo largo de esta investigación se fabricó de la siguiente manera: un tubo de vidrio de 6mm de diámetro y 10cm de longitud (**Pyrex**) fue calentado y extendido por su extremo inferior hasta un diámetro interno de 1mm, punto en el que se seccionó. Cuando el vidrio alcanzó la temperatura ambiente, se sumergió por su extremo pequeño dentro de un vaso de precipitados de 10mL que contenía resina epóxica e iniciador (**Epofix**, Struers) previamente mezclados, hasta que la resina alcanzó por capilaridad una altura de 3mm encima de la punta. En ese momento, el tubo se retiró del vaso y se fijó a un soporte universal con ayuda de pinzas para bureta, de tal forma que la punta tocara la base del soporte universal y que el tubo estuviera vertical. Entonces se introdujo una puntilla de carbón vítreo (**Alfa**) de 1cm de longitud y 1mm de diámetro por la entrada más grande del tubo. El arreglo se mantuvo así durante una semana, tiempo que tardó la resina en polimerizar completamente, crear un soporte 100% impermeable al acetonitrilo y fijar el carbón vítreo a la punta del tubo. El electrodo se pulió con lijas de menor a mayor finura hasta que la superficie del carbón vítreo dejó de presentar irregularidades visibles en el estereoscopio.

El electrodo de referencia **R** se ensambló con la siguiente metodología: un alambre de plata (**Sigma Aldrich**) fue sumergido en una disolución 0.01M en AgNO3 (**Sigma Aldrich**, >99%,) y 0.1M en perclorato de tetrabutilamonio (**Sigma Aldrich**, 99.9%), que había sido colocada previamente dentro de un tubo de vidrio sellado en uno de sus extremos con un vidrio Vycor ® (**Bioanalytical Systems**). El extremo opuesto se tapó herméticamente con un cilindro de poli[tetrafluoroetileno] que poseía un orificio en el

centro ligeramente más pequeño que el alambre de plata (para que al introducirlo en él sellara lo mejor posible). La metodología para construir este electrodo fue adaptada de la referencia [70].

Por otro lado, se construyó un electrodo de pseudoreferencia fijando un alambre de platino (**Sigma Aldrich**) a un tubo de vidrio de 6mm de diámetro, con ayuda de un soplete. Luego, la punta libre del alambre se calentó para que adquiriera forma esférica, y se dobló hasta alcanzar un ángulo de 30° entre ésta y el cuerpo del alambre.

Finalmente, el contraelectrodo C se armó soldando un alambre de platino con una malla de platino. La malla poseía alambres de 0.1mm de diámetro, lo que permitió incrementar varias veces la superficie total del contraelectrodo. La **Figura 13** es una fotografía de los cuatro electrodos construidos tal y como fueron empleados en el arreglo de celda mostrado en la **Figura 14**.

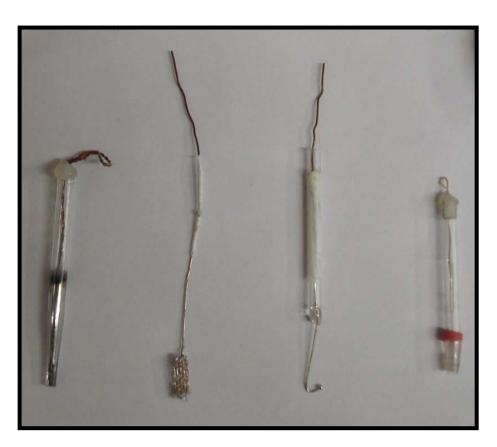


Figura 13. Electrodos de trabajo, contraelectrodo, de pseudoreferencia y de referencia respectivamente.

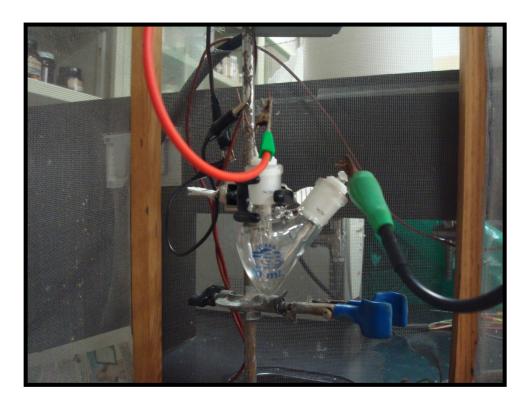


Figura 14. Celda electroquímica

2.2. Preparación de muestras

Los flavonoides analizados en esta investigación provinieron de diferentes fuentes: ocho moléculas, *miricetina*, *quercetina*, *kaempferol*, *flavona*, *catequina* y los cloruros de delfinidina, cianidina y pelargonidina, fueron compradas a **Sigma Aldrich**, con pureza grado HPLC; tres antocianinas, *petunidina-3-glucósido*, *delfinidina-3-glucósido* y *malvidina-3-glucósido*, fueron donadas por la Dra. Janet Gutiérrez del Centro de Biotecnología (**ITESM**, Campus Monterrey) con pureza grado HPLC; y dos antocianinas, *cianidina-3-glicósido* y *delfinidina-3-glicósido*, se extrajeron a partir de los cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*), con pureza grado CPC (sección **2.2.1**).

2.2.1. Extracción y purificación de antocianinas

Las antocianinas de la flor de Jamaica fueron extraídas con el fin de corroborar la utilidad del sistema aprótico para la caracterización de flavonoides dentro de matrices complejas. Esta planta fue seleccionada debido a su alto contenido de antocianinas (2.52g

por cada 100g) [71], y a que al menos una de ellas coincidía con los estándares puros analizados previamente por técnicas voltamperométricas.

La extracción se realizó de la siguiente manera: 100g de cálices triturados fueron colocados dentro de 4 matraces de 500mL (25g c/u). A cada matraz se agregaron 300mL de agua destilada previamente acidificada con ácido clorhídrico concentrado (**Sigma Aldrich**, 0.1% v/v), y los matraces se sometieron a agitación constante por dos horas (25°C). Una vez terminado el tiempo de extracción, cada disolución se separó de sus contenidos sólidos con ayuda de papel filtro (**Whatman No.40**).

El volumen total de extracto, 1200mL, se concentró con ayuda de un rotavapor (**Buchi**, 140rpm y 35°C), hasta obtener tan sólo 20mL de jarabe color morado. Entonces se tomaron alícuotas de 1μL del jarabe y se disolvieron en celdas de cuarzo que contenían metanol (**Sigma Aldrich**, grado HPLC), para posteriormente analizarlas con espectroscopía de UV-Visible (**Perkin Elmer**, Lambda 2S), a una longitud de onda de 520nm. El pico de absorción observado corroboró la presencia de antocianinas en disolución.

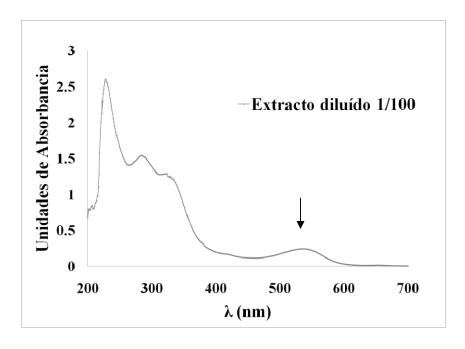


Figura 15. Espectro de absorbancia UV-Visible de una alícuota del extracto butanólico. Dilución 1/100. La flecha muestra el pico de absorbancia en 520nm ±10.

Las antocianinas disueltas en el extracto acuoso de Jamaica fueron extraídas sucesivamente con cloroformo (4 veces, 20mL) y con n-butanol (6 veces, 30mL). El extracto en cloroformo fue descartado, mientras que el extracto butanólico (color rosado) se concentró hasta un volumen final de 100mL (rotavaporación a 40°C, 140rpm). Una alícuota de este último fue evaluada con espectroscopía UV-Visible y corroboró una vez más la presencia de antocianinas disueltas, como se muestra en la **Figura 15**.

En una segunda etapa de purificación, la muestra butanólica se inyectó a un equipo de *Cromatografía de Partición Centrifuga (CPC*, **Kromatron 1000**), y la separación se realizó con las condiciones expuestas en la **Tabla 7.** Se obtuvieron un total de 480 fracciones (13mL cada una, tomadas cada 5min.), que posteriormente fueron concentradas hasta un volumen final de 1mL. La metodología empleada en este apartado fue adaptada de la referencia [72].

Tabla 7. Metodología de separación por *Cromatografia de Partición Centríguga*. Condiciones adaptadas a partir de la referencia [72].

Etapas	Procedimiento
Etapa 1	El rotor se llenó con fase estacionaria (acetato de etilo/n-butanol/agua, 5:5:90), a una velocidad de 100rpm.
Etapa 2	Inyección de 100mL de muestra disueltos en la fase móvil A (acetato de etilo/butanol/agua, 77:15:8). Modo ascendente, 9mL/min, 60min. Se incrementó la velocidad hasta 900rpm. 75% retención de fase estacionaria.
Etapa 3	Se inyectó un gradiente lineal de fase móvil B (acetato de etilo/butanol/agua, 40:46:14) que alcanzó el 50% del volumen móvil total en 100min.
Etapa 4	La inyección se mantuvo isocrática por 60min. Posteriormente, se realizó un segundo gradiente lineal hasta 70% de fase B en 120min.
Etapa 6	El resto de la elución se realizó de manera isocrática, hasta que las fracciones dejaron de presentar coloración y su absorbancia a 520nm fue de cero.

Las fracciones recuperadas de la *CPC* fueron analizadas por *Cromatografia Líquida de Alta Resolución (HPLC* por sus siglas en inglés, **Shimadzu**, Prominence), con el objetivo de corroborar su pureza. La detección se hizo por UV-Visible: λ=520 y 280nm.

Las separaciones en HPLC se realizaron con las condiciones expuestas en la **Tabla 8.** Esta metodología fue adaptada de la referencia [73].

Tabla 8. Condiciones experimentales empleadas para la *Cromatografia Líquida de Alta Resolución*.

Parámetro	Especificaciones		
Columna PLRP-S, Waters.	100Å, 5μM, 250 x 4.6mm.		
Pre-columna: Supelguard.	LC-18-DB		
Fase móvil A	10% Ácido fórmico / Agua		
Fase móvil B	45% MeOH / Agua		
Gradiente Lineal	40-80% de B		
Duración	De 0 a 50min.		

2.2.2. Disoluciones y tratamiento del electrodo de trabajo W

Todas las disoluciones se prepararon a una concentración 0.1M de TFBTEA, 0.5mM de flavonoide (excepto las antocianidinas, 0.1mM) y 0.1mM de Ferroceno, en 10mL de MeCN purificado, excepto aquellas cuyo procedimiento describe condiciones específicas. Las muestras provenientes de la separación cromatográfica se evaporaron con flujo de nitrógeno para evitar su descomposición, y el depósito remanente se disolvió en MeCN con las mismas concentraciones antes descritas.

Debido a que los flavonoides tienden a polimerizar en la superficie del electrodo de trabajo de carbón vítreo, fue necesario seguir una metodología de limpieza previa a cada medición electroquímica para evitar pérdidas de resolución o de sensibilidad durante los experimentos. Esta metodología fue como se describe a continuación: el electrodo de trabajo se pulió durante 10s en una lija del número 2000a, 10s en una lija del número 2000b, 10s sobre una tela con micropartículas de alúmina de 0.3micras en disolución básica (AP-D Suspension, **Struers**) y otros 10s sobre la misma tela, pero esta vez con micropartículas de alúmina de 0.01micras en disolución básica.

Todos los potenciales medidos se reportan respecto al par Ferroceno/Ferrocenio (Fc/Fc⁺), de acuerdo con lo sugerido por la IUPAC [74].

2.3. Técnicas experimentales

La presente investigación estudió los flavonoles: *miricetina, quercetina y kaempferol*; las antocianidinas: *delfinidina, cianidina y pelargonidina*; y las antocianinas: *petunidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido*, con el uso de las técnicas *Voltamperometría Cíclica* (VC, **Sección 1.3.2**) y *Voltamperometría de Onda Cuadrada* (VOC, **Sección 1.3.3**). Para ello y debido a las características inherentes al sistema aprótico empleado (alta resistividad al flujo de corriente), fue necesario utilizar otra técnica preparativa previa, denominada *Compensación IR*, cuyos fundamentos teóricos se explicarán en seguida.

2.3.1. Potenciometría

Los experimentos de este trabajo se desarrollaron con ayuda de un *potenciostato-galvanostato* (**Princeton Applied Research** M273A). El circuito electrónico de este dispositivo aparece simplificado en la **Figura 16**.

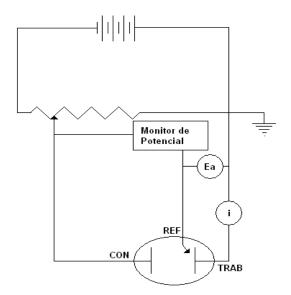


Figura 16. Diagrama de circuito sobre-simplificado de un potenciostato convencional. El monitor de potencial registra las variaciones del potencial existente entre el electrodo de trabajo y el de referencia, y lo ajusta para que se mantenga constante inyectando electrones a través del contraelectrodo.

Un potenciostato es capaz de ejecutar programas de potencial, corriente y tiempo, intercambiando cada una de estas variables como función de las otras. Gracias a su versatilidad, permite monitorear el comportamiento electroquímico de muestras en disolución mientras se realizan experimentos de barrido de potencial, de pulsos de potencial, de pulsos de corriente ó de potencial fijo respecto al tiempo. En estos, las reacciones de transferencia de electrones ocurren sobre la superficie del electrodo de trabajo, que transforma su potencial eléctrico en relación con un electrodo de referencia. Los resultados numéricos son registrados con una computadora que permite graficarlos al instante.

2.3.2. Compensación IR

Un problema común en los experimentos voltamperométricos es el efecto de la resistencia del electrolito (conocido como efecto iR_u ó efecto de la caída óhmica, donde i es corriente y R_u resistencia no compensada) en las mediciones electroquímicas, pues modifica la corriente de respuesta de las reacciones que ocurren sobre la superficie del electrodo de trabajo y genera variaciones aleatorias en el potencial redox formal (E° ') obtenido para una determinada molécula. Este efecto es significativo para sistemas con disolventes que presentan baja solubilidad de electrolitos como el acetonitrilo; sin embargo, puede ser compensado experimentalmente con el uso de la técnica denominada Compensación IR 'o IR Positive Feedback [75].

Tabla 9. Parámetros utilizados en *Compensación IR* siguiendo la nomenclatura del Research Electrochemistry Software 4.0 de EG&G.

Parámetro	Valor
Altura de pulso (PH)	50 mV
% de Compensación (CL)	90 %
Variabilidad (UN)	5%
Rango de Corriente (CR)	1μΑ
Modo IR (IR)	Measured
Electrodo	Solid
Electrodo de Referencia	User

La *Compensación IR* consiste en la adición de una señal en el voltaje de entrada del potenciostato con la misma magnitud que la caída iR_u [76]. Es decir que, en los experimentos, el potenciostato mide la corriente generada durante la aplicación de pulsos de potencial y hace correcciones eléctricas que equivalen a la caída de voltaje en el espacio entre los electrodos de trabajo y de referencia (caída que es inherente al medio resistivo), logrando con esto mantener un potencial fijo en la interfase entre los electrodos. El resultado es una disminución de la variabilidad de las mediciones; hecho que para fines prácticos de esta investigación se traduce en experimentos repetitivos. La **Tabla 9** resume el valor de los parámetros utilizados para la *Compensación IR*.

Los experimentos de *Compensación IR* se repitieron por triplicado con el electrolito puro (MeCN + TFBTEA), el electrolito + la referencia interna (Ferroceno, sección **41**) y el electrolito + la referencia interna + cada flavonoide.

2.3.3. Voltamperometría Cíclica

Las bases teóricas de esta técnica se discutieron en la **Sección 1.3.**2. Las condiciones empleadas en todos los experimentos de este trabajo aparecen condensadas dentro de la **Tabla 10**. En esta, el tiempo de purga corresponde al tiempo mínimo recomendado para desoxigenar el disolvente con nitrógeno y lograr una atmósfera libre de oxígeno antes de cada medición [62], y el tiempo de equilibrio es el mínimo tiempo necesario para estabilizar la corriente de circuito abierto en los valores que ahí aparecen. La ventana de potencial útil obtenida una vez purificado el disolvente y corregida la R_u , fue de 2.1V, comprendida en el rango entre -0.1 V y 2.0V (de ahí los valores de IP y V1).

La velocidad de barrido utilizada para el análisis de flavonoides puros y para las fracciones cromatográficas fue de 20mV/s; sin embargo, el estudio de estabilidad del sistema con ayuda de la ecuación de *Randles* (ec.1) requirió el empleo de otras velocidades que entran en el rango de la tabla.

Los parámetros acerca de la superficie del electrodo de trabajo y el tipo de electrodo de referencia aparecen con valores asignados por convención (**EG&G**, Research Electrochemistry Software 4.0).

Tabla 10. Parámetros utilizados en *VC* siguiendo la nomenclatura del Research Electrochemistry Software 4.0 de EG&G.

Parámetro	Valor	Observaciones
Velocidad de Barrido (SR)	20-140mV/s	Siendo 20mV siempre la velocidad de inicio.
Tiempo de equilibrio (ET)	20s	La corriente de circuito abierto se estabilizaba entre -8 y +8 nA.
Tiempo de Purga (PT)	60s	Tiempo en que se burbujeó nitrógeno en MeCN antes de cada medida.
Potencial inicial	-0.1V	El mismo en todos los experimentos.
Potencial de inversión (V1)	2V	Potencial positivo máximo.
Número de ciclos (NC)	1	-
Ciclo almacenado (SC)	1	-
Modo IR (IR)	Entered	Una vez corregida la Compensación.
Rango de corriente (CR)	10μΑ	Sensibilidad necesaria.
Área del electrodo (EA)	1cm ²	Por convención.
Electrodo Referencia (RE)	User	-
Filtro (FL)	590Hz	Filtra el ruido eléctrico.

2.3.4. Voltamperometría de Onda Cuadrada

Los fundamentos de esta técnica se discutieron en la **Sección 1.3.3**. Los parámetros de *VOC* utilizados durante la experimentación del presente trabajo se exponen en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Parámetros utilizados en *VOC* siguiendo la nomenclatura del Research Electrochemistry Software 4.0 de EG&G.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Altura de pulso (PH)	50mV	Electrodo	Solid
Incremento de medida (SI)	2mV	Área del Electrodo (EA)	1cm ²
Frecuencia (FR)	1Hz	Electrodo de referencia	User
Potencial Inicial (IP)	-0.1V	Filtro	590Hz
Potencial final (FP)	2.0V	Área del Electrodo (EA)	1cm ²
Tiempo de equilibrio (ET)	20s	Electrodo de referencia	User
Modo IR (IR)	Entered	Filtro	590Hz

Como puede observarse, muchos de ellos corresponden también a aquellos empleados en en *VC* y en *Compensación IR*. La velocidad de barrido efectiva de los experimentos fue de 50mV/s, valor suficiente para que los experimentos se realizaran con rapidez y buena definición.

Capítulo 3: Discusión de Resultados

Los resultados experimentales de esta investigación se analizan en tres secciones. En la primera se discuten los efectos de la *Compensación IR y* de la purificación del MeCN para la estabilidad del sistema electroanalítico y la repetitividad de las mediciones. En la segunda se evalúan los datos electroquímicos obtenidos a partir de las técnicas voltamperométricas para cada flavonoide puro estudiado, y se comparan con antecedentes publicados en la literatura que se relacionan con la capacidad antioxidante, la actividad antioxidante, la conducta redox y la estructura de esos compuestos. La tercera está dedicada a la revisión de los resultados obtenidos con las fracciones cromatográficas.

3.1. Estabilización del sistema aprótico

Como primer paso en la validación del sistema empleado para los estudios voltamperométricos, resultó indispensable seleccionar un electrodo de referencia que fuera estable en el medio aprótico durante las mediciones. Las pruebas realizadas, así como sus resultados, se mencionan dentro del siguiente apartado.

3.1.1. Selección del electrodo de referencia

En la sección **2.1.4** de este documento se describió la construcción de un electrodo de pseudoreferencia de platino y de un electrodo de referencia Ag|Ag⁺(0.01M), PCTBA(0.1M). La estabilidad de ambos en acetonitrilo fue evaluada por *Voltamperometría Cíclica*, técnica que permitió observar su comportamiento eléctrico dentro de una disolución 0.1M en TFBTEA (disolución denominada "matriz" de ahora en adelante). A la matriz preparada para evaluar el electrodo de Ag|Ag⁺ se añadió AgNO₃ (0.01M) para completar la celda.

La **Figura 17** presenta dos voltamperogramas obtenidos con el electrodo de referencia Ag|Ag⁺ en diferentes momentos del día. En ella, aparecen procesos anódicos que no debieron ocurrir con la disolución matriz. Además, la imagen comprueba variaciones importantes tanto en las corrientes medidas por el electrodo como en sus potenciales de oxidación.

Los picos anódicos son demasiado grandes (-2.00 µA aprox.) para provenir de algún efecto del disolvente (que teóricamente era 99.8% puro, anhidro), por lo que se revisó la superficie del electrodo de trabajo en el estereoscopio para buscar indicios de pasivación. De acuerdo con lo previsto, la superficie presentó depósitos grisáceos después de cada voltamperometría (un sólo ciclo).

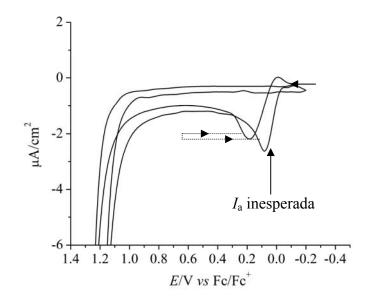


Figura 17. Voltamperogramas cíclicos de TFBTEA (0.1M) y AgNO₃ (0.01M) en acetonitrilo grado HPLC. v. b.: 20mV/s.

Dekanski et al. demostraron en 2001 [77] que la superficie de un electrodo de carbón vítreo es capaz de catalizar reacciones redox de plata en disoluciones básicas de AgNO3, favoreciendo particularmente la espontaneidad de reacciones redox que obedecen las siguientes ecuaciones:

$$Ag \rightarrow Ag^{+} + e^{-}$$

$$Ag^{+} \rightarrow Ag^{2+} + e^{-}$$

$$Ag \rightarrow Ag^{2+} + 2e^{-}$$

Estos procesos ocurren, de acuerdo con lo reportado por el grupo de Dekanski, en potenciales comprendidos entre 0.30 y 0.70 volts para medio acuoso. Puesto que el acetonitrilo es un disolvente básico por su grupo nitrilo y que los barridos de potencial realizados en el presente trabajo abarcaron un rango de potenciales similar, el depósito

presente sobre la superficie del electrodo de trabajo se relacionó con la formación de un depósito de Ag₂O inducido por el método electroquímico. Este factor fue determinante en la búsqueda de una alternativa para el electrodo de referencia, pues el óxido de plata cambiaba la actividad del electrodo de trabajo desde el primer ciclo experimental.

También, se realizaron voltamperometrías cíclicas con una disolución matriz que contenía Fc 0.5mM. El resultado de tales experimentos se muestra en la **Figura 18**, en la cual se observa una sobreposición de señales anódicas correspondientes a las oxidaciones del AgNO₃ y del Fc. Este empalme de corrientes descartó por completo la utilidad del electrodo Ag/Ag⁺ para fines de la presente investigación.

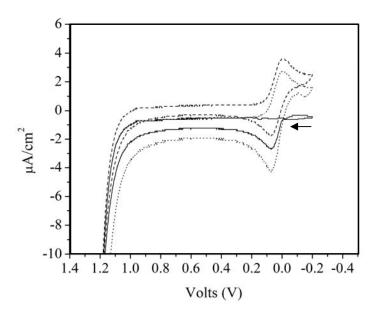


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos: *Línea contínua*: misma imagen que Figura 17; *Guiones*: acetonitrilo 0.1M en TFBTEA, 0.01M en AgNO₃ y 0.5mM en Fc; *Línea punteada*: voltamperograma de la mezcla de las dos disoluciones anteriores. El pico de corriente anódica en el proceso reversible del Fc incrementa desproporcionadamente respecto al pico catódico. *Todos:* Vel. Barrido: 20mV/s.

El electrodo de pseudoreferencia de platino (**R**), por otro lado, presentó un comportamiento adecuado durante los experimentos. Los electrodos de pseudoreferencia suelen ser estables; sin embargo, su potencial es desconocido y depende de la composición de la disolución muestra en la que se encuentran. Consecuentemente, todos los experimentos realizados con el empleo de platino requirieron la adición de ferroceno como referencia interna, por lo que los potenciales aquí reportados son relativos al par

redox Fc/Fc⁺. La ventana de potencial obtenida con la disolución madre fue de 1.50V, y se muestra en la **Figura 19**.

Aún con la estabilidad del electrodo de referencia, los voltamperogramas de la disolución matriz + Fc mostraron variabilidad en la determinación del potencial formal del Ferroceno ($E_{Fc}^{\circ\prime}$) equivalente a \pm 0.05V (promedio, ver **Figura 20**), y la ventana de potencial disponible tras la inclusión de Fc en la disolución matriz se restringió a tan solo 0.60V.

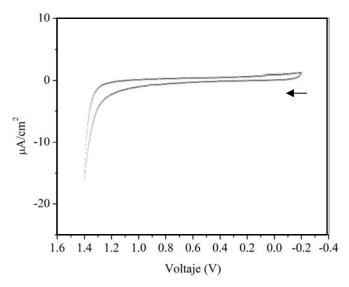


Figura 19. Voltamperograma cíclico de disolución madre obtenido con uso del electrodo de pseudoreferencia de platino. Vel. Barrido: 20mV/s. Ventana de potencial= 1.50V.

De los resultados anteriores se desprendieron las necesidades de ampliar la ventana de potencial y de purificar el disolvente, asuntos que se solucionaron con ayuda del tratamiento descrito en el apartado siguiente.

3.1.2. Efecto de la purificación del disolvente

El acetonitrilo empleado en este trabajo de tesis fue purificado de acuerdo con la metodología descrita en la sección **2.1.2**. La purificación se realizó con el propósito de eliminar impurezas básicas, ácidas y trazas de agua. El uso de acetonitrilo puro se hace evidente en la repetitividad obtenida durante los experimentos de *VC*, cuyos resultados se muestran en la **Figura 21**.

Como puede notarse, los diferentes voltamperogramas expuestos en la gráfica (siete en total) se sobreponen perfectamente unos con otros. Además, se observó un incremento en la ventana de potencial de 0.60V a 1.50V aproximadamente, a partir del voltaje en el cual terminan o inician los procesos redox del Ferroceno y hasta la línea vertical que aparece en la **Figura 21**.

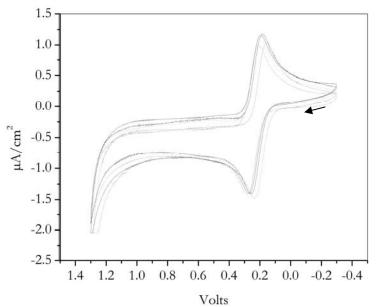


Figura 20. Voltamperogramas cíclicos de Fc 1mM en disolución matriz. Cinco repeticiones. *Todas*: Velocidad de barrido= 90mV/s.

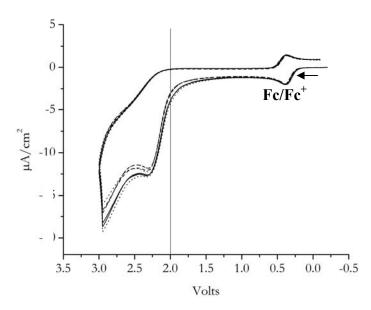


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de Fc 0.5mM. Siete repeticiones hechas a una velocidad de barrido de 90mV/s. La purificación del disolvente permitió obtener repetitividad en el sistema, y extendió la ventana de potencial hasta 1.50V.

Ahora bien, ya con el electrodo de referencia funcionando, la variabilidad en las mediciones corregida y la ventana de potencial adecuada, la última corrección experimental realizada en el sistema fue la *Compensación IR*, cuyos resultados se describen a continuación.

3.1.3. Efecto de la Compensación IR

Cuando el potenciostato aplica un programa de potencial en un electrodo idealmente polarizable (IPE, por sus siglas en Inglés) sumergido dentro de una disolución, el resultado eléctrico generado puede representarse esquemáticamente como un circuito RC (**Figura 22**). En ese circuito, el voltaje total aplicado debe ser igual a los voltajes existentes en el capacitor, E_C , y en el resistor, E_R , de acuerdo con la expresión:

$$E_{Total} = E_C + E_R = iR_u + \frac{q}{C_d}$$
 ec. 3

donde $R_{\rm u}$ es la resistencia no compensada y $C_{\rm d}$ es la capacitancia diferencial de la doble capa formada en la superficie del electrodo.

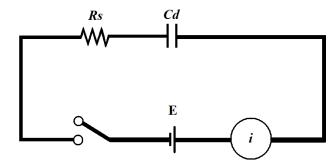


Figura 22. Representación esquemática de un programa de potencial en un circuito RC.

Ahora bien, si el programa aplicado es un barrido de potencial, como en el caso de la *Voltamperometría Cíclica* o de la *Voltamperometría de Onda Cuadrada*, el voltaje total varía de manera proporcional respecto al tiempo, E=vt, de tal forma que la ecuación ec. 3 se transforma a: $vt = iR_u + \frac{q}{c_d}$. Si se integra esta expresión, la solución obtenida describe el comportamiento de la corriente en función de la resistencia R_u y de la capacitancia de doble capa C_d , como aparece en la ecuación siguiente:

$$I_c = vC_d \left[1 - e^{-\left(\frac{t}{R_u C_d}\right)} \right] \qquad \text{ec. 4}$$

Debido a que en estos experimentos el potencial cambia de manera constante, siempre hay flujo de una corriente capacitiva, I_c , que proviene de la igualdad expuesta en **ec.4**. Así, la relación entre las corrientes de pico, I_p , anódicas ó catódicas (**ec. 1**) y las corrientes capacitivas, I_c , (**ec. 4**) es:

$$\frac{|I_C|}{I_p} = \frac{C_d v^{\frac{1}{2}} (10^{-5})}{2.69 n^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} C}$$
 ec.5

El análisis matemático desarrollado hasta aquí resulta indispensable para discutir los efectos de la *Compensación IR* sobre el sistema electroanalítico propuesto en este trabajo. Como muestran las ecuaciones **ec. 4** y **ec. 5**, las corrientes capacitivas son directamente proporcionales a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, e inversamente proporcionales a la concentración molar del analito. Es decir: a velocidades mayores y a concentraciones bajas, la I_c aumenta e, inherentemente, el voltamperograma se deforma, presentando potenciales E_a o E_c que no solamente están desplazados de su valor real, sino que además difieren de este conforme la velocidad de barrido se incrementa.

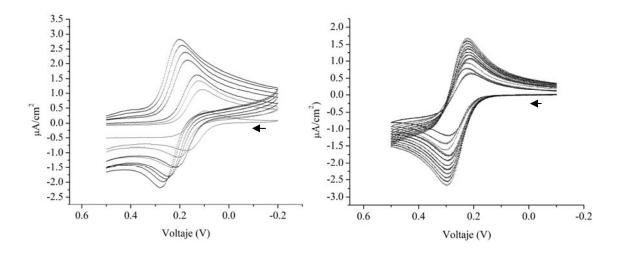


Figura 23. Voltamperogramas cíclicos de Fc en acetonitrilo purificado. *Izquierda*: 0.1mM, ocho barridos con velocidades de: 20, 40, 60, 70, 110, 130, 140 y 160mV/s, sin compensación de R_u . *Derecha*: 0.2mM, cincuenta y cinco barridos, cinco por cada velocidad: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120mV/S, R_u = 210Ω.

La **Figura 23** muestra voltamperogramas del proceso reversible correspondiente al par Fc/Fc^+ realizados antes y después de compensar la caída óhmica. En ella puede notarse un cambio radical del comportamiento de los voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido. Puesto que las disoluciones empleadas poseían concentraciones de 0.1 y 0.2mM respectivamente, era esperado ver un desplazamiento de potenciales durante los barridos con las velocidades más rápidas, como dicho en párrafos anteriores. Sin embargo, la corrección de R_u con un valor de 210 Ω hizo que todos los voltamperogramas expuestos en la imagen de la derecha partieran prácticamente de la misma línea base (0.00 A), y presentaran picos de corriente anódicos y catódicos coincidentes en un mismo potencial.

3.1.4. Sistema aprótico final

La ecuación **ec. 1**, conocida como ecuación de *Randles-Sevcik*, establece que la corriente I_p generada durante una voltamperometría cíclica es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Así, una gráfica de I_p vs $v^{1/2}$ es una línea recta, a partir de cuya pendiente pueden calcularse constantes específicas como el coeficiente de difusión del analito o su concentración (en caso de que fuera desconocida). Sin embargo, debido a que la relación anterior es una función de la respuesta del experimento, la ecuación **ec. 1** también puede ser empleada para verificar la repetitividad de los voltamperogramas y, por lo tanto, validar la estabilidad del sistema aprótico sugerido.

La **Figura 24** muestra voltamperometrías cíclicas del par Fc/Fc^+ realizadas con las mismas condiciones que las expuestas en la **Figura 23** (*Derecha*), pero con los datos experimentales normalizados a un E° ' de 0.00V a partir de la ecuación:

$$\left(E = E_{Medido} - \left(\frac{E_c + E_a}{2}\right)\right)$$
 (ec. 6)

La normalización de datos generó una gráfica donde los picos anódicos y catódicos son perfectamente identificables. Esto permitió hacer la linearización de *Randles* que, como esperado, correlacionó las corrientes de pico con la raíz cuadrada de las velocidades de barrido en forma lineal. La **Figura 25** muestra este resultado.

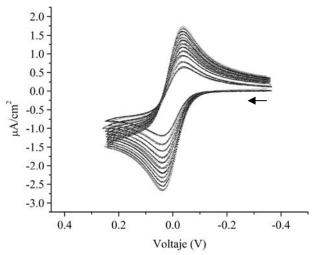


Figura 24. Voltamperogramas de Fc 0.2mM a velocidades de: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120mV/s. R_u =210 Ω , E° '=0.00V.

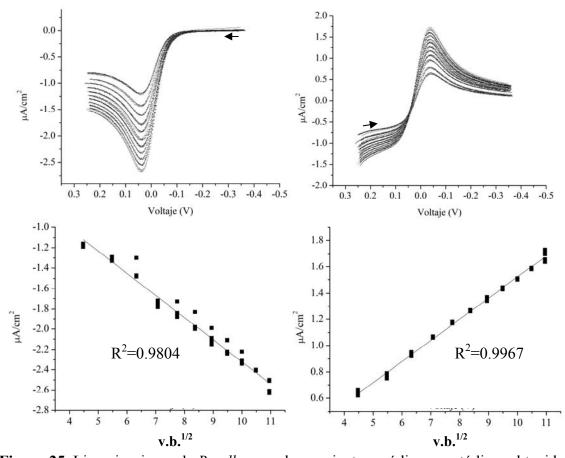


Figura 25. Linearizaciones de *Randles* para las corrientes anódicas y catódicas obtenidas a partir de cincuenta y cinco voltamperometrías cíclicas de la disolución matriz + 0.2mM Fc. La desviación estándar promedio entre cada cinco repeticiones realizadas a la misma velocidad fue de 0.045 y de 0.011 para los picos anódicos y catódicos respectivamente.

Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos fueron de 0.980 y de 0.996 para las corrientes anódica y catódica respectivamente. Las desviaciones estándar promedio (σ) entre las cinco repeticiones realizadas a cada velocidad de barrido fueron de 0.045 para las corrientes anódicas y de 0.011 para las catódicas. Estos resultados demuestran que el sistema aprótico sugerido en el presente escrito, conformado por un electrodo de trabajo de carbón vítreo, un electrodo de pseudoreferencia de platino y un contraelectrodo de malla de platino sumergidos en acetonitrilo, es perfectamente estable y garantiza la validez de la información generada a través de experimentos voltamperométricos realizados con él.

3.2. Parámetros electroquímicos de flavonoides

Un dibujo esquemático de los once flavonoides estudiados en esta investigación aparece en la **Figura 26**. Las estructuras ahí expuestas demuestran su parentesco químico y se dividen en cinco subclases de flavonoides: los flavonoles, que difieren unos de otros por el número de sustituyentes hidroxilo ubicados en su anillo B; las antocianidinas, presentadas como sales y también diferentes entre sí en el número de hidroxilos sobre su anillo B; las antocianinas, que son antocianidinas glucosiladas en la posición 3 del anillo C y que se diferencian entre ellas por el tipo de sustituyentes presentes en su anillo B (metóxidos); la flavona, que es el esqueleto básico de todo flavonol; y un flavanol que, a diferencia de todas las otras moléculas, no posee insaturaciones en el anillo C. Los apartados siguientes exponen la información electroquímica recaudada durante los experimentos voltamperométricos de estos compuestos.

3.2.1. Análisis voltamperométrico de flavonoles

Las figuras encontradas en esta sección y la que sigue muestran voltamperogramas cíclicos y de onda cuadrada obtenidos con cada uno de los flavonoides analizados. Debido a que la respuesta al estímulo de potencial fue diferente en magnitud I_p entre ellos (aún estando todas las disoluciones a una misma concentración), los ejes de las ordenadas fueron ajustados para lograr la mejor definición de los procesos redox respectivos. El potencial observado en todos los voltamperogramas está reportado en relación al E° '_{Fc/Fc+}.

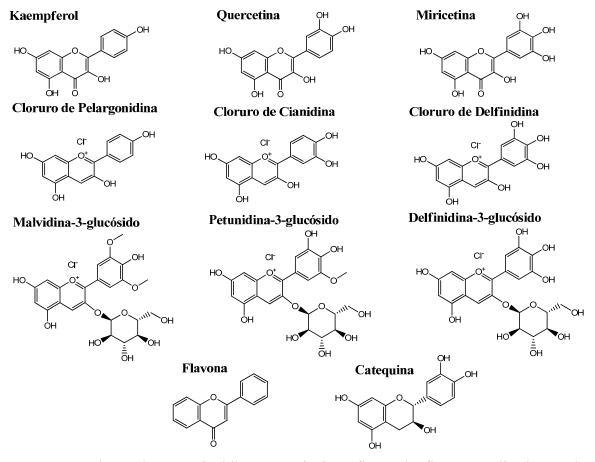


Figura 26. Flavonoles, antocianidinas, antocianinas, flavanol y flavona analizados en el presente trabajo.

El kaempferol, **Figura 27**, presentó dos procesos de transferencia electrónica al electrodo de trabajo en sus voltamperogramas cíclicos, uno registrado en 523±7mV (**I**) y otro en 1155±10mV (**II**). Estas observaciones concuerdan con los resultados de Chen *et al.* (2008) [78] y de Zheng *et al.* (2008) [79], que emplearon un electrodo de grafito pirolítico como electrodo de trabajo en disoluciones acuosas y de sulfóxido de dimetilo respectivamente, y también reportaron sólo dos procesos redox para esta molécula.

Chen et al. han sugerido con pruebas experimentales que el segundo proceso oxidativo del kaempferol (II) en VC corresponde a la oxidación de un dímero. El fenóxido creado sobre el anillo B durante la primera oxidación se estabiliza en la posición 3 de la estructura flavonoide [80] y ataca otra molécula de kaempferol neutra, Figura 28. Lo anterior propone que sólo el primer pico en el voltamperograma de un flavonoide corresponde con 100% de certeza a la desprotonación de alguno(s) de los sustituyentes

hidroxilo presentes en su anillo B; los demás pueden estar asociados con procesos redox de estructuras generadas en reacciones acopladas al proceso de transferencia electrónica.

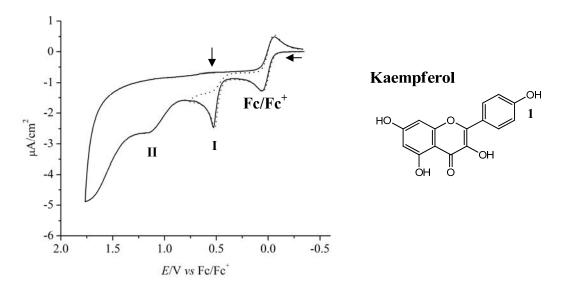


Figura 27. Voltamperogramas cíclicos de kaempferol 0.5mM y Fc 0.1mM en disolución matriz. v. b.= 20mV/s. El proceso redox del par Fc/Fc⁺ está normalizado a 0.00V en ambos lados. La flecha negra vertical indica indicios de reversibilidad de la reacción.

Figura 28. Mecanismo creado a partir de las conclusiones de Chang *et al.* para la reacción química acoplada a la primera oxidación electroquímica del kaempferol.

Por otro lado, si bien existe una aparente irreversibilidad del primer pico anódico en el voltamperograma cíclico del kaempferol, los estudios realizados con voltamperometría de onda cuadrada, **Figura 29**, proponen que la primer transferencia de electrones sí es reversible (flecha negra en **Figura 27**), pues se observa un pico diferencial perfectamente

simétrico que corresponde al potencial formal de la primera oxidación de la molécula $(E^{\circ}'=443\text{mV}\pm10)$. Esta observación también concuerda con las referencias anteriores y se discute junto con los resultados obtenidos para la quercetina.

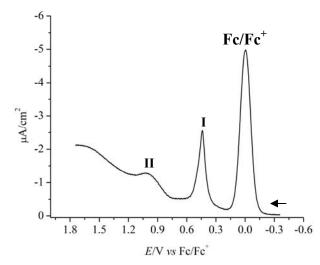


Figura 29. Voltamperograma de onda cuadrada de kaempferol 0.5mM y Fc 0.1mM en disolución matriz. ΔE =50mV, f=1Hz. El proceso redox del par Fc/Fc⁺ está normalizado a 0.00V en ambos lados.

Ahora bien, la quercetina, **Figura 30**, presentó tres procesos anódicos en sus voltamperogramas cíclicos, registrados en potenciales de 492±10 (**I**), 806±10 (**II**) y 1331±10mV (**III**) respectivamente. Su comportamiento durante tales experimentos se mostró similar a los resultados obtenidos por Ana M. O. Brett y Mariana E. Ghica en medio acuoso, que fueron descritos dentro de la **Sección 1.3.2** de este documento. Lo anterior, aunado a los resultados obtenidos con el kaempferol, corrobora que aunque el acetonitrilo es un disolvente con constante dieléctrica y características químicas diferentes a las del agua, permite estudiar a los flavonoides con resultados concordantes entre ambos medios.

Las flechas negras verticales en la figura muestran indicios de procesos catódicos asociados con sus respectivos picos de corriente anódica; sin embargo, como en el caso del kaempferol, no es posible percibir las señales del barrido inverso en su totalidad, debido posiblemente a que ambos flavonoides pasivan el electrodo **W** desde su primera oxidación, depositando en él un polímero rojizo que, de acuerdo con Jorgensen *et al.* (1998) [81], es formado por su estructura oxidada (una quinona).

El voltamperograma de onda cuadrada correspondiente a la quercetina, **Figura 31**, presenta un pico perfectamente simétrico en un potencial E° '= 355±10mV (**I**). Este hecho sugiere también reversibilidad de la primera reacción redox en la superficie del electrodo, igual que en el caso del kaempferol, aunque no se observan claramente corrientes catódicas en el barrido reverso de los voltamperogramas cíclicos expuestos en la **Figura 30**. Además, el voltamperograma de onda cuadrada muestra otros tres procesos redox; sin embargo, con las técnicas empleadas en este proyecto es imposible determinar si corresponden a los procesos óxido reducción del resto de los sustituyentes hidroxilo presentes en la estructura de la quercetina, o a otras reacciones acopladas (como el caso particular del kaempferol).

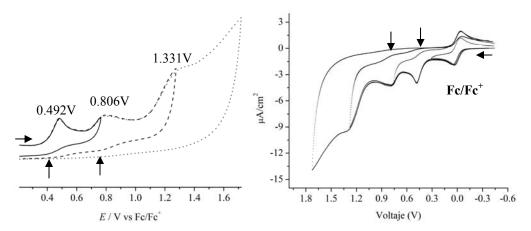


Figura 30. *Izquierda*. Tres voltamperogramas cíclicos de quercetina 0.5mM y Fc 0.1mM en disolución matriz con diferentes ventanas de potencial (resultados expuestos con la misma conveción de la referencia 64). *Derecha. V*oltamperogramas cíclicos con la misma ventana de potencial. v.b. para todos: 20mV/s.

El primer pico en aparecer después del proceso correspondiente al Fc/Fc⁺ (I) puede relacionarse con la desprotonación del(de los) hidroxilo(s) presente(s) en la posición 4' del anillo B; sin embargo, los otros tres procesos no presentaron picos definidos ni simétricos, posiblemente como resultado de radicales formados de menor estabilidad que el primero y/o varias reacciones de trasferencia de electrones simultáneas.

La miricetina, el tercer flavonol, exhibió tres picos anódicos durante las voltamperometrías cíclicas, con potenciales de 348±10 (I), 770±10 (II) y 1199±10mV (III). Su comportamiento en términos de reversibilidad y de adsorción sobre el electrodo de carbón vítreo fue similar al de los dos flavonoles anteriores. Este compuesto presentó

tres procesos redox simétricos durante los experimentos voltamperométricos de onda cuadrada (E° '=310±10 (I), 743±10 (II) y 1238±10mV (III), Figura 32 (aunque las tranferencias II y III no fueron tan definidas como la I). El comportamiento voltamperométrico de la miricetina concuerda con lo ya reportado por Koyama *et al.* (2008) [82] en medio acuoso.

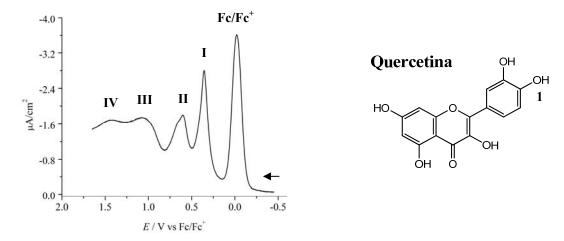


Figura 31. Voltamperograma de quercetina 0.5 mM y Fc 0.1 mM en disolución matriz. Onda Cuadrada, $\Delta E = 50 \text{mV}$, f = 1 Hz. El primer pico en aparecer después del proceso correspondiente al Fc/Fc⁺ puede relacionarse con la desprotonación del hidroxilo presente en la posición 4' del anillo B.

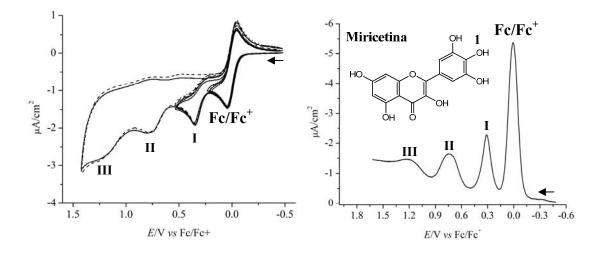


Figura 32. *Izquierda*. Voltamperogramas cíclicos de miricetina 0.5mM y Fc 0.1mM en disolución matriz. v.b.: 20mV/s. *Derecha*. Voltamperogramas de onda cuadrada, Δ*E*=50mV, *f*=1Hz.

En la **Tabla 12** se condensan los parámetros electroquímicos determinados experimentalmente para los tres flavonoles analizados en esta sección. El apartado

siguiente contiene los resultados equivalentes obtenidos con las antocianidinas consideradas en el presente trabajo.

Tabla 12. Parámetros electroquímicos determinados para cada flavonol con el uso de técnicas voltamperométricas.

Flavonol	$n (-OH)^a$	E° '(mV) ^b	No. I_{pa}	$E_{\mathrm{pa}}\left(\mathrm{mV}\right)^{\mathrm{c}}$
Kaempferol	1	443±10	2	523±10, 1155±10
Quercetina	2	355±10	3	492±10, 806±10, 1331±10
Miricetina	3	310±10	3	398±10, 770±10, 1199±10

^a Hidroxilos presentes en el anillo B.

3.2.2. Análisis voltamperométrico de antocianidinas

Las antocianidinas presentaron dos inconvenientes experimentales durante la preparación de muestras:

- Su solubilidad en acetonitrilo es baja (0.1mM, máxima solubilidad lograda).
- Su disponibilidad para la presente investigación fue tan solo de 1mg por antocianidina (limitación relacionada con el costo comercial de las moléculas).

Estas condiciones dificultaron el análisis de datos y exigieron un ajuste de las escalas en los voltamperogramas, mismo que se realizó con el objetivo de presentar claramente los procesos redox correspondientes a cada uno de los tres compuestos.

El cloruro de pelargonidina, **Figura 33**, mostró dos procesos anódicos durante las voltamperometrías cíclicas, uno localizado en un potencial de 657±10mV (**I**) y otro en 1308±10mV (**II**). El cloruro de cianidina también exhibió dos picos de oxidación en potenciales más positivos, 742±10mV (**I**) y 1312±10mV (**II**) respectivamente. Sin embargo, el cloruro de delfinidina presentó tres procesos anódicos en los potenciales

^b Primer proceso redox de cada molécula.

^c La incertidumbre en los valores proviene de la variabilidad observada entre mediciones durante los experimentos. No fue calculada por métodos estadísticos. Es igual para todos los potenciales determinados.

443±10mV (I), 752±10mV (II) y 1255±10mV (III), **Figura 34**. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por De Lima *et al.* (2007) [83], pues el desplazamiento de los potenciales anódicos para estas tres antocianidinas mostró un comportamiento similar en sus disoluciones con la misma molaridad pero diferente disolvente (metanol).

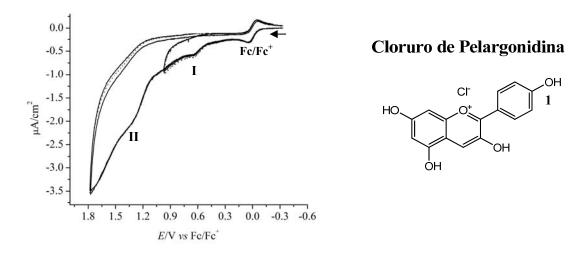


Figura 33. Voltamperogramas cíclicos de cloruro de pelargonidina 0.1mM y Fc 0.1mM en disolución matriz. v.b.: 20mV/s.

Tabla 13. Parámetros electroquímicos determinados para cada antocianidina con el uso de técnicas voltamperométricas.

Antocianidina	$n \left(-OH \right)^a$	E° '(mV) ^b	No. I_{pa}	$E_{\mathrm{pa}}\left(\mathrm{mV}\right)^{\mathrm{c}}$
C. Pelargonidina	1	545±10	2	657±10, 1308±10
C. Cianidina	2	408±10	2	742±10, 1279±10
C. Delfinidina	3	286±10	3	443±10, 752±10, 1255±10

^a Hidroxilos presentes en el anillo B.

El grupo de De Lima no discutió con mayor detalle la reversibilidad de los procesos anódicos observados en voltamperometría cíclica. Para tal efecto, la **Figura 35** muestra

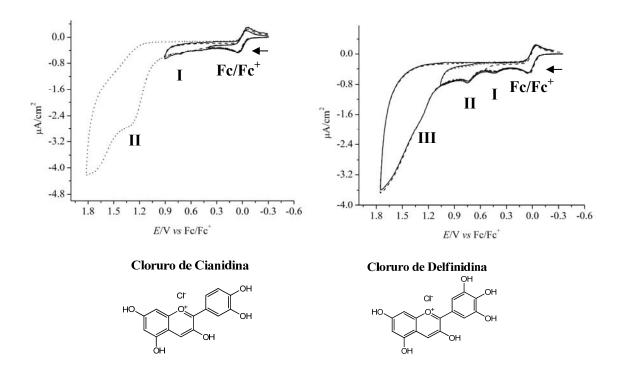
^b Primer proceso redox de cada molécula.

^c La incertidumbre en los valores proviene de la variabilidad observada entre mediciones durante los experimentos. No fue calculada por métodos estadísticos. Es igual para todos los potenciales determinados.

los resultados de las voltamperometrías de onda cuadrada realizadas con cada una de las tres antocianidinas en esta investigación.

Como puede observarse en la figura, los cloruros de pelargonidina, cianidina y delfinidina presentaron tres, cuatro y cuatro procesos anódicos diferenciales en sus respectivos voltamperogramas de onda cuadrada. Tomando en cuenta los potenciales formales del primer proceso redox exclusivamente (picos simétricos), es posible asumir que su comportamiento es reversible como el de los flavonoles, y que la observación de este fenómeno en los estudios cíclicos se vio limitada por la adsorción de las moléculas oxidadas sobre la superficie del electrodo.

Los parámetros electroquímicos obtenidos para estos tres flavonoides aparecen condensados en la **Tabla 13**.



Figuras 34. *Izquierda*. Voltamperogramas cíclicos de cloruro de cianidina 0.1mM y Fc 0.1mM en disolución matriz. *Derecha*. Voltamperogramas cíclicos de cloruro de delfinidina 0.1mM en disolución matriz. v.b.: 20mV/s.

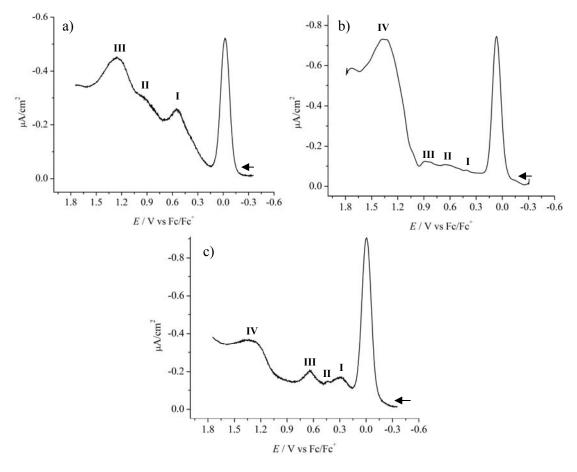


Figura 35. Voltamperogramas de onda cuadrada de los cloruros de a) pelargonidina, b) cianidina y c) delfinidina, ΔE =50mV, f=1Hz.

3.2.3. Estructura molecular y electrónica, E° y actividad antioxidante

Retomando lo expuesto en la sección **1.3.1** de este documento, se sabe que los flavonoides actúan como antioxidantes gracias a dos actividades químicas específicas: i) su capacidad para acomplejarse con metales catalizadores de reacciones oxidativas y ii) su poder para secuestrar radicales libres. Las relaciones encontradas entre la estructura molecular, la estructura electrónica y el E° , que repercuten en ambas actividades se discuten a continuación.

i) Acomplejamiento de flavonoides y potencial E° '.

Los sustituyentes hidroxilo presentes en la estructura de los flavonoides funcionan como grupos donadores de electrones durante la formación de compuestos de coordinación. Estas moléculas ofrecen tres ligandos bidentados: uno creado por el

hidroxilo en R^3 y el carbonilo en R^4 (**b**), aquel constituido por el hidroxilo en R^5 y el carbonilo en R^4 (**a**), y el último conformado por los orto-hidroxilos ubicados en el anillo B (**c**, Figura 36).

$$\begin{array}{c} \text{OH } \mathbf{c} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \\ \mathbf{a} \end{array}$$

Figura 36. Sitios de unión a complejos metálicos. La quercetina actúa como ligando bidentado.

Los sitios preferidos para el acomplejamiento con metales bivalentes como el Fe²⁺, el Mg²⁺ y el Zn²⁺ son las zonas **b** y **c** en la **Figura 36** [84], pues los hidroxilos presentes en tales regiones son los más ácidos de la molécula de acuerdo con lo descrito en la **Tabla 6** y, por lo tanto, los más fáciles de desprotonar. Lo anterior es particularmente importante debido a que los complejos metal-flavonoide requieren de la oxidación del antioxidante hasta su estructura semiquinónica o quinónica, para que los grupos oxígeno de este último puedan donar electrones a la capa de valencia incompleta del metal. Además, la planaridad de las regiones **b** y **c** originada por el sistema electrónico resonante de estos compuestos contribuye a la formación de complejos tetracoordinados, hexacoordinados y octacoordinados.

Ahora bien, en los resultados experimentales de este trabajo de tesis se encontró una relación lineal entre el número de sustituyentes hidroxilo en el anillo B del flavonoide y su potencial E° , **Figura 37**.

La **Figura 37** prueba que la desprotonación de los flavonoides se facilita proporcionalmente con del grado de oxidación de su anillo B. Si la capacidad de formación de complejos depende de la desprotonación de los grupos OH presentes en ese anillo, entonces debe existir también una relación lineal entre los E° , y su habilidad para asociarse con metales.

En la actualidad, no existen trabajos dentro de la literatura científica que investiguen la formación de complejos flavonoide-metal con varias familias de esta subclase de

polifenoles. Sin embargo, sí hay reportes que brindan resultados numéricos sobre la capacidad de estos compuestos para reducir metales, como es el caso de lo reportado por Mira *et al.* (2002) [85].

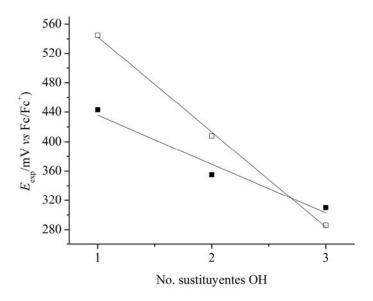
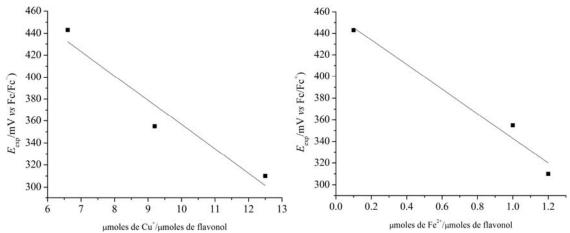


Figura 37. Correlación entre los E° ' determinados por voltamperometría de onda cuadrada y el número de sustituyentes en el esqueleto de los flavonoides. (\blacksquare) Flavonoles, (\square) Antocianidinas.

Asumiendo que el flavonoide reduce primero a un metal para posteriormente acomplejarse con él (aunque este primer paso no es obligatorio), la relación entre el número de equivalentes de metal reducido por el antioxidante y su E° ' debe ser un buen indicador de la capacidad de acomplejamiento de estas moléculas. Así, la disposición de los potenciales formales determinados en esta investigación para los flavonoles como función de los resultados numéricos obtenidos por Mira *et al.* para la reducción del Cu^{2+} y el Fe^{3+} aparece en la **Figura 38**.

Esta figura corrobora que la capacidad antioxidante de un flavonoide, vista desde la perspectiva de su actividad como agente quelante, es favorecida por el grado de oxidación en el anillo B del polifenol. Además, el resultado anterior concuerda con el número de ligandos disponibles por equivalente de flavonol: dos para el kaempferol, tres para la quercetina y cuatro para la miricetina.



 $μmoles de Cu^*/μmoles de flavonol$ Figura 38. Relaciones lineales entre el E° ' y los equivalentes reducidos de Fe3+ y Cu2+ en el trabajo de Mira et~al.

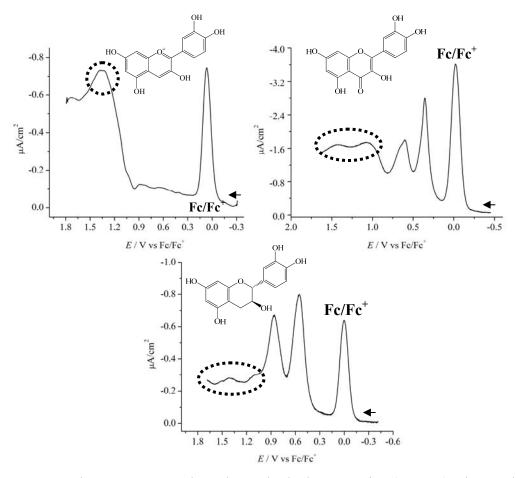


Figura 39. Voltamperogramas de onda cuadrada de quercetina (0.5mM), cloruro de cianidina (0.1mM) y catequina (0.5mM). ΔE =50mV, f=1Hz.

ii) Actividad secuestradora de radicales y E°'.

Todos los valores de *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) empleados en esta sección fueron extraídos de la referencia [86]. El TEAC es un indicador de la actividad antioxidante de compuestos reductores, que se define como la concentración de una disolución de Trolox con capacidad antioxidante equivalente a la disolución 1mM de la molécula en estudio. El TEAC refleja la habilidad de una substancia para donar protones y neutralizar al radical catiónico ABTS*+ (2,2'-azinobis(3-Etilbenzotiazolin-6-sulfonato)) [87].

Las observaciones más importantes del presente trabajo, relacionadas con la actividad secuestradora de radicales de los flavonoides, provienen de correlaciones entre los resultados voltamperométricos obtenidos y la información reportada actualmente en la literatura.

a) Efecto de la insaturación 2-3 del anillo C en la actividad antioxidante.

En su artículo, Rice-Evans *et al.* (1996) [86] afirman que la presencia de una insaturación en la posición 2-3 del anillo C de los flavonoides es indispensable durante el proceso de deslocalización electrónica que estabiliza al radical aroxilo formado tras una donación de protones. Por su parte, Lien E.J. *et al.* (1999) [88] han reportado que la contribución de esta insaturación al índice TEAC no es estadísticamente significativa.

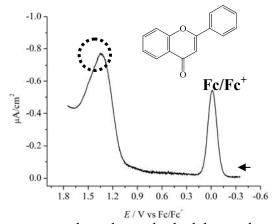


Figura 40. Voltamperograma de onda cuadrada del esqueleto de flavona 0.5mM. ΔE =50mV, f=1Hz.

La **Figura 39** mostrada en la página 56 presenta los voltamperogramas obtenidos con la quercetina, el cloruro de cianidia y la catequina. La **Figura 40** expone lo mismo para el esqueleto de flavona.

Ahora, tomando en cuenta ambas figuras, es posible realizar tres observaciones acerca del efecto de la insaturación sobre la actividad antioxidante y el potencial formal de los cuatro compuestos. Primera, que la catequina, cuya estructura carece de la insaturación en el anillo C, es el único flavonoide que no presentó un E° equivalente a 1350 ± 10 mV vs Fc/Fc⁺. Además, el potencial formal de la primera oxidación de este compuesto es 144mV más positivo que el equivalente de la cianidina, y 297mV más positivo que el correspondiente de la quercetina, aún cuando los sustituyentes en sus anillos B respectivos son idénticos.

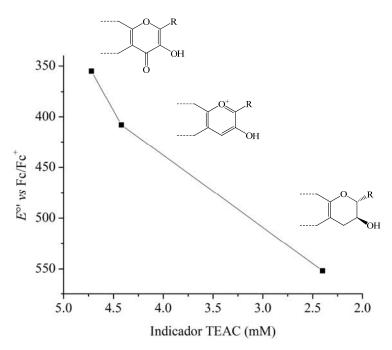


Figura 41. Efecto de las insaturaciones en el anillo C sobre la capacidad antioxidante de flavonoides, expresada con el indicador TEAC. R=catecol.

Segunda, que la estructura resonante conjugada, formada por el equilibrio ceto-enólico presente en el anillo C de la quercetina, aporta mayor estabilidad al radical aroxilo que la doble insaturación en el anillo C de la cianidina. Y tercera, que la doble insaturación en la

cianidina, a su vez, contribuye en mayor medida a la actividad antioxidante que la carencia de insaturaciones en el ciclo C de la catequina.

La **Figura 41** muestra el efecto final de las características estructurales discutidas en los párrafos anteriores sobre el indicador TEAC correspondiente a la quercetina, la cianidina y la catequina, extraído de la referencia [86].

b) Papel del hidroxilo sobre el carbono 3 del anillo C en la actividad antioxidante.

De acuerdo con lo expuesto en la **Tabla 6** de este documento y con el análisis desarrollado por Heim *et al.* (2002) [89], la presencia de un sustituyente hidroxilo en la posición 3 del anillo C juega un papel importante en la actividad antioxidante de los flavonoides. Los electrones del oxígeno se reubican constantemente, intercambiándose con las insaturaciones presentes en el ciclo C, y brindan estabilidad al radical aroxilo originado durante la reducción de una especie oxidante.

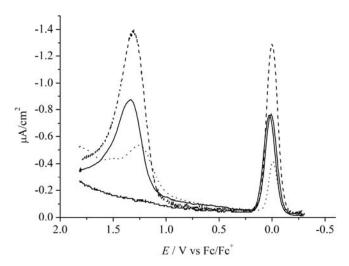


Figura 42. Voltamperometrías de onda cuadrada de los glucósidos de delfinidina (línea continua), malvidina (línea segmentada) y petunidina (línea punteada) 0.1mM. El proceso anódico observado a la izquierda corresponde a trazas de butanol empleado durante la extracción de estos compuestos. El voltamperograma de base muestra el comportamiento de la delfinidina-3O-glucósido sin trazas de butanol.

La eliminación de este sustituyente genera una disminución considerable del indicador TEAC en estudios realizados con quercetina y rutina, de 4.7±0.1mM hasta 2.4±0.12mM; es decir, una pérdida equivalente a la mitad de su poder antioxidante. En este trabajo, se

analizaron por voltamperometría de onda cuadrada tres antocianinas: malvidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido; con el fin de comparar al menos el E° ' del cloruro de delfinidina con el de su equivalente glucosilado, y con el de otras dos moléculas poseedoras de diferentes sustituyentes en el anillo B. Los voltamperogramas obtenidos se presentan en la **Figura 42**.

Como puede observarse en los voltamperogramas, particularmente en el que corresponde a la delfinidina-3O-glucósido, los procesos anódicos diferenciales observados durante el análisis de su respectiva aglicona no aparecen. La glucosa eterificada con el hidroxilo ubicado en la posición 3 del esqueleto flavonoide ha desplazado los potenciales redox de la delfinidina hacia valores más positivos, de tal forma que no se observan en la ventana de potencial disponible. Este resultado corrobora la importancia del hidroxilo mencionado en la actividad antioxidante de estos compuestos e, inherentemente, en su potenciales formales.

c) Influencia de la hidroxilación del anillo B en la actividad antioxidante.

Como ya se expuso en el *i*) de esta sección, existe una correlación entre el número de sustituyentes hidroxilo presentes sobre el anillo B y el potencial redox formal de los flavonoides; aunque esta relación no parece repetirse cuando se compara el grado de hidroxilación del ciclo aromático B con la actividad antioxidante [86].

Debido a que los potenciales formales de las moléculas dictan su comportamiento químico durante las reacciones redox en las que participan, parece coherente jerarquizar los flavonoides analizados en función de sus potenciales formales. La **Tabla 14** muestra el resultado de esta operación que, como esperado, generó resultados interesantes.

La actividad antioxidante de los flavonoides proviene de una mezcla de factores, entre los que se encuentran el potencial redox formal y la estabilidad estructural del radical formado. A partir de lo discutido en el *a*) de este segmento y de los resultados reportados por Guzmán *et al.* (2009) [90], es posible asumir un orden de estabilidad estructural para los flavonoides aquí evaluados, que se relaciona con su respectivo potencial formal, bajo las condiciones descritas a continuación:

Tabla 14. Jerarquización de flavonoides en función de su E° '. Los valores EC50_(DPPH) fueron extraídos de la referencia [91].

Potenciales E°' (mV vs Fc/Fc ⁺)	Nombre del compuesto	Indicador TEAC	EC50 _(DPPH) (mM)	Estructura estabilizadora
552±10	Catequina	2.40±0.05	6.00	Ciclo C saturado
545±10	C. Pelargonidina	1.30±0.10		Insaturación 2-3
443±10	Kaempferol	1.34±0.08	18.8	C=O, insat.2-3
408±10	C. Cianidina	4.40±0.10		Insaturación 2-3
355±10	Quercetina	4.72±0.10	5.50	C=O, insat.2-3
310±10	Miricetina	3.12±0.28	3.60	C=O, insat.2-3
286±10	C. Delfinidina	4.40±0.10		Insaturación 2-3

- El kaempferol estabiliza radicales sobre el hidroxilo ubicado en la posición 3 del anillo flavonoide, y esta estabilización recibe un valor arbitrario de 1.
- La quercetina estabiliza radicales con ayuda de la formación de puentes de hidrógeno en la estructura catecol del anillo B, con un valor arbitrario de 2.
- La miricetina estabiliza radicales de la misma forma que la quercetina, pero con dos sitios catecol disponibles para tal efecto, y recibe un valor de 3.
- Todas las estructuras flavonoides que comparten estas características reciben la misma ponderación.

Así, los potenciales formales de los flavonoides se relacionan directamente con la estabilidad del radical formado después de la reducción de la especie reactiva. Como dicho en la página 58 de este documento, la catequina no estabiliza radicales en la posición 3 de su estructura debido a que carece de insaturaciones en el anillo C, hecho que conlleva un desplazamiento de su E° hacia el valor más positivo de la tabla.

En casos como el del cloruro de pelargonidina y el kaempferol, los potenciales obedecen también estas reglas. Como ambos compuestos poseen el mismo valor de estabilidad, 1, la diferencia numérica entre sus potenciales está definida por la presencia o ausencia del grupo oxo en el anillo C. Así, el radical formado sobre el kaempferol es más

estable que aquél generado en el cloruro de pelargonidina y por consiguiente, su potencial formal es menor.

Si bien estas conclusiones no parecen explicar las actividades antioxidantes expuestas en la **Tabla 14**, sí ofrecen una justificación al orden establecido por los E° , que es una función de la estabilidad de los radicales formados. La actividad antioxidante debe relacionarse también con la cinética propia de la formación de especies reactivas, que tal vez es sensible a las moleculas reductoras presentes en el medio, y con el impedimento estérico existente entre los formadores de radicales sintéticos y la molécula antioxidante.

El último apartado de este documento contiene los resultados obtenidos sobre la caracterización de flavonoides acoplada a un sistema de cromatografía de partición centrífuga.

3.3. Caracterización por voltamperometría de onda cuadrada

Como parte importante de la proposición de sistemas útiles para la evaluación química de polifenoles, se analizó la utilidad del análisis electroquímico desarrollado en esta investigación para la caracterización de flavonoides inmersos dentro de matrices complejas.

Un extracto vegetal (o un extracto de Jamaica para fines prácticos de esta investigación), contiene gran cantidad de moléculas orgánicas que contribuyen a su actividad antioxidante y a su respuesta electroquímica total. Por tal motivo, es indispensable someterlo a un proceso de purificación química previo a su análisis voltamperométrico.

Con lo anterior en mente, el extracto butanólico de Jamaica preparado se inyectó en un cromatógrafo de partición centrífuga, que realizó la separación de analitos bajo las condiciones especificadas en la **Sección 2.2.1** de este documento. Las 480 fracciones recuperadas después de la separación presentaron un pico de absorbancia a una longitud de onda de 520nm (HPLC analítica), característico de la presencia de antocianidinas en

disolución ácida. Sin embargo, prácticamente ninguna fracción mostró un cromatograma limpio (con un pico único) cuando se empleó detección en λ=280nm.

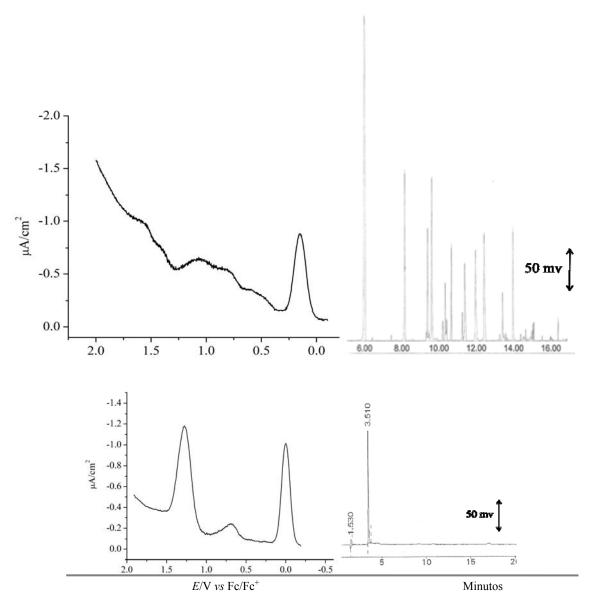


Figura 43. Voltamperogramas de onda cuadrada típicos del extracto crudo y de las fracciones 275-285, con sus respectivos análisis cromatográficos.

Las fracciones comprendidas entre las número 279 y 301, que presentaron los cromatogramas más limpios en λ=280nm, fueron purificadas en un último paso con columnas Sep-Pak C-18 y, posteriormente, re inyectadas al cromatógrafo de líquidos de alta resolución. De las 22 fracciones, 10 presentaron un pico único en el cromatograma,

medido a un tiempo de retención de 3.510min. Su separación realizada con detección en λ =520nm corroboró la presencia de un solo pico con ese mismo tiempo de retención.

La **Figura 43** muestra un ejemplo de los voltamperogramas típicos del extracto crudo y de esas diez fracciones purificadas. Como puede observarse en ella, la técnica voltamperométrica aplicada con la celda propuesta permitió la identificación de un pico anódico, en un potencial E° '=686±10mV.

Ahora bien, pese a que en la literatura se reporta la presencia de delfinidina y cianidina glucosiladas en los extractos de Jamaica, los voltamperogramas de los glucósidos puros no permitieron la identificación de ningún proceso redox comprendido entre 0.2 y 1.2 V.

Desafortunadamente, el tiempo destinado al desarrollo de este proyecto de tesis terminó antes de realizar cualquier otro estudio de caracterización instrumental del pico observado. Labor de futuras investigaciones será investigar si la estructura que lo origina corresponde a un polifenol.

Capítulo 4: Conclusión

La actividad antioxidante de los polifenoles proviene de sus características estructurales, de su configuración electrónica y de la cinética y la termodinámica que dictan su comportamiento durante las reacciones redox en las que participan. Contruir tablas que permitan jerarquizar estos compuestos de acuerdo con su poder antioxidante es una labor complicada, pues implica el uso inherente de diversos parámetros químicos.

Los resultados de este trabajo brindan información útil para comprender mejor la química redox de las moléculas estudiadas, y corroboran una importante relación entre estructura y actividad electroquímica. Próximas investigaciones deberán tomar en cuenta esta información como base para la discusión de resultados que relacionen a los polifenoles con actividades antioxidantes específicas.

Bibligrafía

[1] Pietta, P.G.; "Flavonoids as antioxidants," J. Nat. Prod., 2000, 63:1035.

- [2] Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M.; "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging," *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **1993**, 90:7915.
- [3] Kaiser, G.; "Biology tutorials for cell, metabolism and genetics," *CCBC Student Linux Server*: http://student.ccbcmd.edu/~gkaiser/biotutorials/ (accessado el 28 de febrero del año 2009).
- [4] ICT4US, *Mnemonic Devices*: Chemistry. http://www.ict4us.com/index.php (accesado el 28 de febrero del año 2009).
- [5] Cimen, M.Y.B.; "Free radical metabolism in human erythrocytes," *Clin. Chim. Acta*, **2008**, 390:1.
- [6] Kaur, I.P.; Geetha, T.; "Screening Methods for antioxidants-A review," *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2006**, 6:305.
- [7] Mateas, J.M.; Sánchez-Jiménez, F.M.; "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy," *Int. J. Biochem. Cell. B.*, **2000**, 32: 157.
- [8] International Food Information Council. "Antioxidants: Working towards a definition," Food Insight Newsletter, 1998, November. http://www.ific.org/foodinsight/1998/nd/ (accessado el 22 de febrero del año 2009).
- [9] Gyorgy, P.; Tomarelli, R.; "Antioxidant activity in sources of the B vitamins," *J. Bio Chem.*, **1943**, 147(3):515.
- [10] Cardiovascular disease: diet, nutrition and emerging risk factors; Stanner, S. Ed.; The report of the British Nutrition Foundation Task Force, *Blackwell Publishing*, UK, **2005**.
- [11] Aruoma, O.I.; "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1998**, 75(2): 199.
- [12] Dimitrious, B.; "Sources of natural phenolic antioxidants," Trends in Food Sci Tech, **2006**, 17:505.
- [13] Clifford, M.; Brown, J.E.; Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Andersen, O; Markham, K., Ed., *Taylor and Francis*, **2006**: 223.
- [14] Arts, I.C.W.; "Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States)," *Cancer Causes Control*, **2002**, 13: 373.
- [15] Arts, I.C.W.; "Dietary catechins and epithelial cancer incedence: the Zutphen Elderly Study," *Int. J. Cancer*, **2001**, 92: 298.
- [16] Knekt, P.; "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms," *Am. J. Epidemiol.*, **1997**, 146: 223.
- [17] Le Marchand, L.; "Intake of flavonoids and lung cancer," J. Nat. Cancer Inst., 2000, 92:154.
- [18] Garcia-Closas, R.; "Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona," *Int. J. Nutr. Cancer*, **1998**, 32: 154.
- [19] Tapas, A.R.; Sakarkar, D.M.; Kakde, R.B.; "Flavonoids as Nutraceuticals: A review," *Trop. J. Pharm. Res.*, **2008**, 7(3):1089.

- [20] Kroon, P.; Williamson, G.; "Polyphenols: Dietary components with established benefits to health," *J. Sci. Food Agric.*, **2005**, 85: 1239.
- [21] Ramos, S.; "Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention," *J. Nutr. Biochem.*, **2007**, 18: 427.
- [22] Tapas, A.R.; Sakarkar, D.M.; Kakde, R.B.; "Flavonoids as Nutraceuticals: A review," *Trop. J. Pharm. Res.*, **2008**, 7(3):1089.
- [23] Lule, S.u.; Xia, W.; "Food phenolics, pros and cons: A review," Food Rev. Inter., 2005, 21:367.
- [24] Urquiaga, I.; Leighton, F.; "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress," *Biol. Res.*, **2000**, 33(2):55.
- [25] Clifford, M.; Brown, J.E.; Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Andersen, O; Markham, K., Ed., *Taylor and Francis*, **2006**: 243.
- [26] Beecher, G.R.; "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake," *Nutr.*, **2003**, 133(10): S248.
- [27] Kuhnau,J.; "Flavonoids and their role in human nutrition," *Qual. Plant.-Pl. Fds. Hum. Nutr.*, **1973**, 23(1-3): 119.
- [28] Tapieiro, H.; Tew, K.D.; Ba, G.N.; Mathé, G.; "Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?" *Biomed Pharmacother.*, **2002**, 56: 200.
- [29] Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G.; "Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade." *Molecules*, **2007**, 12:1679.
- [30] Clifford, M.N.; "Diet-Derived Phenols in plasma and tissues and their implications for health," *Planta. Med.*, **2004**, 70: 1103.
- [31] Szajdek, A.; Borowska, E.J.; "Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review," *Plant Foods Hum. Nutr.*, **2008**, 63:147.
- [32] Ferrari, C.K.B.; "Functional foods and physical activities in health promotion of aging people," *Maturitas*, **2007**, 58: 327.
- [33] Aherne, S. A.; O'Brien, N.M.; "Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism," *Nutr.*, **2002**, 18: 75.
- [34] Yang, RZ.; Wei, XL.; Gao, FF.; Wang, LS.; Zhang, HJ.; Xu, YJ.; Li, CH.; Ge, YX.; Zhang, JJ.; Zhang, J.; "Simultaneous analysis of anthocyanins and flavonols in petals of lotus (Nelumbo) cultivars by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216: 106.
- [35] Bao, J.; Cai, Y.; Sun, M.; Wang, G.; Corke, H.; "Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (Myrica rubra)extracts and their color properties and stability," *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (6): 2327.

- [36] Butelli, E.; Titta, L.; Giorgio, M.; Mock, H.P.; Matros, A.; Peterek, S.; Schijlen, E.G.W.M.; Hall, R.D.; Bovy, A.G.; Luo, J.; Martin, C.; "Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors," *Nat. Biotech.*, **2008**, 26(11):1301.
- [37] Huber, L.S.; Hoffmann-Ribani, R.; Rodríguez-Amaya, D.; "Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonoles and flavones," *Food Chem.*, **2009**, 113: 1278.
- [38] Pinent, M.; Castell, A.; Baiges, I.; Montagut, G.; Arola, L.; Ardévol, A.; "Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells," *CRFSFS*, **2008**, 7:299.
- [39] Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C.; "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data," *Free radical boil. med.*, **2000**, 29(11): 1106.
- [40] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L.; "The chemistry behind Antioxidant capacity assays," *J.Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(6): 1841.
- [41] Apak, R.; Güclü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Celik, S.E.; Bektasoglu, B.; Berker, K.I.; Özyurt, D.; "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay," *Molecules*, **2007**, 12: 1496.
- [42] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L.; "The chemistry behind Antioxidant capacity assays," *J.Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(6): 1841.
- [43] Vestergaard, M.; Kerman, K.; Tamiya, E.; "An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids usin disposable pencil graphite electrodes: possible implications in copper-mediated illnesses," *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 538: 273.
- [44] Corredor-Sánchez, P.E.; "Natural Antioxidants: Their Electrochemistry and Determination in Plant Material and Biological Fluids," *Purdue University Graduate School*: Thesis acceptance, Purdue, USA: 2007.
- [45] Blasco, A.J.; Rogerio, M.C.; González, M.C.; Escarpa, A.; "Electrochemical index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A proposal," *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 539: 237.
- [46] Brenna, O.; Buratti, S.; Cosio, M.S.; Mannino, S.; "A new HPLC method for the determination of polyphenols in wines based on the use of less aggressive eluents and a coupled revelation system," *Electroanalysis*, **1998**, 10(17): 1204.
- [47] Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommes, J.; "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests," Food Chem., **2009**, 113: 1226.
- [48] Filipiak, M.; "Electrochemical analysis of polyphenolic compounds," *Analyt. Sci.*, **2001**, 17: i1667.
- [49] Cuvelier, M.E.; Maillard, M.N. "Revue: Comment évaluer l'efficacité des antioxydants alimentaires?" *Sci Aliments.*, **2007**, 27: 259.
- [50] Heijnen, C.G.M.; Haenen, G.R.M.M.; Acker, F.A.A.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A.; "Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups," *Toxicol. Vitro*, **2001**, 15: 3.
- [51] Andjelkovic', M.; Camp, J.V.; Meulenaer, B.; Depaemelaere, G.; Socaciu, C.; Verloo, M.; Verhe, R.; "Iron chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups," *Food Chem.*, **2006**, 98: 23.

- [52] Nafisi, S.; Shamloo, D. S.; Mohajerani, N.; Omidi, A.; "A comparative study of caffeine and theophylline bindind to Mg(II) and Ca(II) ions: studied by FTIR and UV spectroscopic methods," *J. Mol. Struc.*, **2002**, 608: 1.
- [53] Seddigi, Z. S.; "Hartree–Fock (HF) method and Density functional theory calculations of methanol to gasoline (MTG) reaction," *Arab. J Sci. Eng.*, **2004**, 29(2A): 155.
- [54] Sakata, K.; Norio, S.; Honda, T.; "Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins," *Tetrahedron*, **2006**, 62(15): 3721.
- [55] Meyer, M.; "Ab initio study of flavonoids," Int. J. of Quantum Chem., 2000, 76: 724.
- [56] Leopoldini, M.; Pitarch, I.P.; Russo, N.; Toscano, M.; "Structure, Conformation, and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. A First Principle Theoretical Study," *J. Phys. Chem.*, 2004, 108(1): 92.
- [57] Heijnen, C.G.M.; Haenen, G.R.M.M.; Vekemans, J.A.J.M.; Bast, A.; "Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship," *Environ. Toxicol. Pharma.*, **2001**, 10: 199.
- [58] Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N.; "Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational and electronic features," *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48 (8): 3232.
- [59] Antonczak, S.; "Electronic description of four flavonoids revisited by DFT method," *J. Molec. Struc.*, **2008**, 856: 38.
- [60] Born, M.; Carrupt, P.A.; Zini, R.; Brée, F.; Tillement, J.P.; Hostettmann, K.; Testa, B.; "Electrochemical behaviour and antioxidant activity of some natural polyphenols," *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79: 1147.
- [61] Markovic', D.A.; Djarmati, Z.; Jankov, R.M.; Markovic', D.M.; Ignjatovic', L.; "Electrochemical behaviour of rosmanol-9-ethyl ether, a diterpene lactone antioxidant isolated from Sage," *Mikrochim. Acta*, **1996**, 124: 219.
- [62] Scholz, F. Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications; *Springer:* Verlag Berlin Heidelberg: **2002**.
- [63] Chevion, S.; Roberts, M.A.; Chevion, M.; "The use of cyclic voltammetry for the evaluation of Antioxidant capacity," *Free Rad. Biol. Med.*, **2000**, 28(6): 860.
- [64] Brett, A.M.O.; Ghica, M.E.; "Electrochemical oxidation of quercetin," *Electroanalysis*, **2003**, 15(22): 1745.
- [65] Mirceski, V.; Komorsky-Lovric, S.; Lovric, M.; Square-Wave Voltammetry: Theory and Application, ed. Scholz, F.; *Monographs electrochem.*, Springer, **2007**: 6.
- [66] Dos santos, L.B.O.; Abate, G.; Masini, J.C.; "Determination of atrazine using square wave voltammetry with the Hanging Mercury Drop Electrode (HMDE)," *Talanta*, **2004**, 62: 667.
- [67] Bard, A.J.; "The electrochemistry of organic compounds in aprotic solvents: methods and applications," *Pure Appl. Chem.*, **1971**, 25(2): 379.
- [68] Coetzee, J.F.; "Purification of acetonitrile and tests for impurities," *Pure Appl. Chem.*, **1966**, 13(3): 427.

- [69] Handbook of electrochemistry, Zoski, C. G., Ed.; *Elsevier*: Amsterdam, N.L., **2007**: 66.
- [70] Bott, A.W.; "Practical Problems in Voltammetry 3: Reference Electrodes for Voltammetry," *Curr. Sep.*, **1995**, 14(2): 64.
- [71] Domínguez-López, A.; Remodetto, G.E.; Navarro-Galindo, S.; "Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (Hibiscus sabdariffa L. cv. 'Criollo') infusion," *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2008**, 43: 322.
- [72] Renault, J.H.; Thépenier, P.; Zéches-Hanrot, M.; Le men-Olivier, L.; Durand, A.; Foucault, A.; Margraff, R.; *J. Cromatogr. A*, **1997**, 763: 345.
- [73] Merken, H.M.; Beecher, G.R.; "Measurement of food flavonoides by High-Performance Liquid Chromatography: a review," *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(3): 576.
- [74] Gritzner, G.; Kuta, J.; "Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents," *Pure & Appl. Chem.*, **1984**, 56(4): 461.
- [75] Zhang, J.; Guo, Si-X.; Bond, A.M.; "Discrimination and Evaluation of the Effects of Uncompensated Resistance and Slow Electrode Kinetics from the Higher Harmonic Components of a Fourier Transformed Large-Amplitude Alternating Current Voltammogram," *Anal. Chem.*, **2007**, 79: 2276.
- [76] Brown, E.R.; Smith, D.E.; "A Study of Operational Amplifier Potentiostats Employing Positive Feedback for iR Compensation," *Anal. Chem.*, **1968**, 40(10): 1279.
- [77] Dekanski, A.; Stevanovic, J.; Stevanovic, R.; Jovanovic, V.M.; "Glassy carbon electrodes. II. Modification by immersion in AgNO₃," *Carbon*, **2001**, 39: 1207.
- [78] Chen, G.; Ma, X.; Meng, F.; Li, G.; "The electron transfer reactivity of kaempferol and its interaction with amino acid residues," *Bioelectrochemistry*, **2008**, 72: 169.
- [79] Zheng, X.F.; Zao, J.; Chen, G.F.; Liu, S.L.; Li, G.X.; "Electroanalysis of kaempferol using pyrolytic graphite and a Hemoglobin/polysorbate-20 modified electrodes," *J. Anal. Chem.*, **2008**, 63(4): 381.
- [80] Takahama, U.; "Oxidation products of kaempferol by superoxide anion radical," *Plant Cell Physiol.*, **1987**, 28(5): 953.
- [81] Jorgensen, L.V.; Cornett, C.; Justese, U.; Skibsted, L.; Dragsted, L.; "Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoide C-ring," *Free Rad. Res.*, **1998**, 29: 339.
- [82] Koyama, J.; Morita, I.; Kobayashi, N.; Konoshima, T.; Takasaki, M.; Osakai, T.; Tokuda, H.; "Correlation between oxidation potentials and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of flavonoids," *Cancer Lett.*, **2008**, 263: 61.
- [83] De Lima, A.A.; Sussuchi, E.M.; Giovani, W.F.; "Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins," *Croat. Chem. Acta*, **2007**, 80(1): 29.

- [84] Morel, I., Cillard, P. and Cillard, J. "Flavonoid–metal interactions in biological systems", In: Rice-Evans, C. and Packer, L., eds, Flavonoids in Health and Disease. *Marcel Dekker*, New York, **1998**: pp 163–177.
- [85] Mira, L.; Fernández, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florêncio, M.H.; Jennings, K.R.; "Interactions of flavonoids with Iron and Copper ions: a mechanism for their antioxidant activity," *Free Rad. Res.*, **2002**, 36(11): 1199.
- [86] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G.; "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Rad. Biol. Med.*, **1996**, 20(7): 933.
- [87] Sánchez-Moreno, C.; "Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems," *Food Sci Tech Int.*, **2002**, 8(3): 121.
- [88] Lien, E.J.; Ren, S.; Bui, H. H.; Wang, R.; "Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants," *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26(3,4): 285.
- [89] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J.; "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, 13: 572.
- [90] Guzmán, R.; Santiago, C.; Sánchez, M.; "A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins," *J. Molec. Struc.*, **2009**, 935: 110.
- [91] Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C.; "Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical," *Talanta*, **2007**, 71: 230.