



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS DE ALGUNAS
DIHIDROXI-ANTRAQUINONAS

TESIS PARA OBTENER EL GRADO EN
DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)
PRESENTA: ALMA KARINA RIVAS SÁNCHEZ

DIRECTORAS DE TESIS: MA. TERESA RAMÍREZ SILVA
ANNIA GALANO JIMÉNEZ

MAYO 2021

*“Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias.
No todo es matemáticas y no todo es simple lógica,
también se trata de belleza y poesía”
María Montessori*

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Autónoma Metropolitana por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y a cada uno de los profesores que me formaron.
- A CONACyT por la beca otorgada durante los estudios de doctorado (269183).
- Al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil plasmar en palabras toda la gratitud que tengo hacia las personas que estuvieron involucradas en el transcurso de este proyecto aportando nuevas ideas y comentarios, que permitieron mejorar e integrar todos los estudios realizados.

Agradezco con mucho cariño a la Doctora María Teresa Ramírez Silva por el compromiso que siempre tuvo hacia mí, la dedicación y la pasión por transmitir ese conocimiento y experiencia. No solo fue mi guía cuando las cosas no salían como esperábamos sino una amiga que siempre me animó, me aconsejó y me apoyó en todo momento.

A la Doctora Annia por la coasesoría en la parte de la teoría, por sus enseñanzas y su tiempo.

A la Doctora Dafne Guzmán por el apoyo en los estudios de electroquímica, por la paciencia y motivación y aunque formalmente no fue mi asesora de tesis se portó como una de ellas involucrándose mucho en este proyecto.

Quiero expresar mi agradecimiento al doctor Manuel Palomar de la UAM-A por su contribución en el análisis de resultados del artículo publicado y al Doctor Mario Romo de la UAM-A por la escritura y edición del paper.

Al Dr. Joel Ireta de la UAM-I y a la Dra. Patricia Balderas de la UAEM por revisar continuamente los avances de este proyecto y por su aporte en la revisión de la Tesis.

Por las observaciones, las explicaciones y comentarios para la mejora de este escrito, mi agradecimiento al Dr. Carlos Galán de la UAEH, al Dr. Rodolfo Balderas de la UNAM y la Dra. Gaby Roa de la UAEM.

A mi compañeros y amigos de posgrado, Ana, Julio Vega, Obdulia y Reyna gracias por la convivencia durante este trayecto, un placer coincidir.

Gracias a mi familia, en especial a mi madre por creer en mí en todo momento por su cariño y paciencia, por sus enseñanzas de vida y ser un ejemplo por seguir, todo el amor y admiración para ti.

A mis hermanos, Erika, Israel, Geymy y Raúl, por su apoyo en cada etapa de mi vida por consentirme siempre cada uno a su manera.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	IV
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
1.1 Antraquinonas: Breve descripción	2
1.1.1 Quinizarina.....	5
1.1.2 Antrarufina	5
1.1.3 Crisazina	6
1.1.4 Antraflavina.....	6
1.2 Constantes de acidez.....	7
1.2.1 Valores de pK_a reportados en la literatura.....	8
1.3 Complejos de inclusión	9
1.4 Actividad antioxidante	11
1.4.1 Métodos para determinar capacidad antioxidante	11
CAPITULO 2. OBJETIVOS	15
2.2 Objetivos general	15
2.2 Objetivos particulares.....	15
CAPITULO 3. METODOLOGÍA.....	18
3.1 Reactivos	18
3.2 Mediciones de pH	18
3.3 Mediciones espectrofotométricas	18
3.3.1 Estudios de estabilidad	18
3.3.2 Determinación de las constantes de acidez	18
3.3.3 Complejo de inclusión del sistema Quinizarina-2Hp β CD.....	19

3.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo con \cdot DPPH.....	19
3.3.5 Cuantificación de Quinizarina mediante espectroscopia UV-Vis.....	20
3.4 Mediciones electroquímicas	20
3.4.1 Cuantificación de quinizarina mediante VC	21
3.4.2 Capacidad antioxidante mediante el uso de biosensores amperométricos	21
3.5 Detalles computacionales	21
3.5.3 Protocolo QM-ORSA.....	22
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Estudio de estabilidad de DHAQ	26
4.2 Propiedades electrónicas de la DHAQ	28
4.3 Estimaciones de la constante de acidez por medio de Parámetros Ajustados (PA)	32
4.4 Constantes de acidez experimentales.....	34
4.5 Análisis topológico, energía de enlace de hidrógeno (<i>EHB</i>) y relación con valores de pK_a experimentales.....	38
4.6 Constante de formación del complejo de inclusión.....	42
4.7 Estudio electroquímico de Quinizarina	47
4.8 Estudio de la capacidad antioxidante de las DHAQ.....	48
4.8.1 Reacción del radical \cdot DPPH con DHAQ	48
4.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante con Biosensores amperométricos enzimáticos.....	51
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS	58
ANEXOS.....	74

Anexo A. Estabilidad de DHAQ	74
Anexo B. Descripción del programa computacional SQUAD	74
Anexo C. Coeficientes de absortividad molar (ϵ)	78
Anexo D. Biosensor Enzimático Amperométrico	81
Anexo E. Orden de desprotonación	86
Anexo F. Optimización de geometría	87
Anexo G. Cuantificación de Quinizarina en presencia de otras dihidroxi-antraquinonas estudiadas	88
Anexo H. Protocolo QM-ORSA	93
Anexo G. Publicación derivada de este proyecto	106

ABREVIATURAS

2Hp β CD	2-Hidroxi-propil β - ciclodextrina
ABTS	Ácido 2-2'-azino-bis 3-etilbenzotrazolina-6 sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDs	Ciclodextrinas
COSMO	Método de solvatación tipo conductor
CPE	Electrodo de pasta de Carbono
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad
DHAQ	Dihidoxi-antraquinonas
DPPH	2-2 Difenil-1-picril hidracilo
FRAP	Poder antioxidante de reducción de Hierro
H ₂ Afv	Antraflavina
H ₂ Arf	Antrarufina
H ₂ Cz	Crisazina
H ₂ Qz	Quinizarina
HT	Transferencia de Hidrógeno
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación

ORAC	Capacidad atrapadora de radicales Oxígeno
PA	Parámetros ajustados
QM-ORSA	Protocolo basado en química cuántica para la evaluación de la actividad captadora de radicales libres
RAF	Formación del aducto radicálico
RL	Radicales Libres
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SET	Transferencia Electrónica
SMD	Densidad del modelo de solvente
SQUAD	Coeficientes de estabilidad a partir de datos de Absorbancia
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TST	Estado de transición
U	Suma de mínimos cuadrados no lineales
VC	Voltamperometría cíclica
β	Constante global de formación
σ_T	Desviación estándar global

RESUMEN

En el siguiente trabajo se llevó a cabo un estudio espectrofotométrico, electroquímico y computacional (DFT) de algunas dihidroxi-antraquinonas (Quinizarina, Antrarufina, Crisazina y Antraflavina) con el fin de caracterizar algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Se presenta una estimación de los valores de pK_a con cálculos basados en estructura electrónica como primera aproximación, estos valores fueron utilizados como datos de entrada de SQUAD (un programa diseñado para determinar constantes de acidez a partir de datos de absorbancia) junto con los espectros de absorción obtenidos mediante espectroscopia UV-Vis para determinar los valores de pK_a experimentales. La determinación mostró valores más bajos para Antraflavina cuya estructura no presenta formación por puente de hidrógeno, esta observación condujo a calcular las energías de enlace por análisis topológico de Bader basado en la densidad electrónica, este estudio reveló una tendencia de fortaleza de enlace que parece justificar el valor de pK_a de crisazina, en cuanto a quinizarina y antrarufina las interacciones de enlace no parecen ser suficientes para demostrar el orden de acidez, esto se debe a que las diferencias de energías de enlaces son pequeñas, sin embargo, las diferencias de los valores de pK_a experimentales determinados también lo son. La baja solubilidad de las DHAQ a pH 7.00 en medio acuoso permitió llevar a cabo un estudio espectrofotométrico de la interacción de la 2Hp β CD con quinizarina, que se eligió modelo. Como resultado de la interacción se obtuvo una constante de inclusión de 2.53 con estequiometría 1:1. Un estudio del comportamiento electroquímico de 2Hp β CD con quinizarina, confirmó la formación del complejo. Las propiedades de actividad antioxidante fueron investigadas mediante el uso del ensayo con el radical \cdot DPPH y biosensores enzimáticos amperométricos mostrando que las DHAQ no son antioxidantes eficientes en la reducción de RL.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



CAPITULO 1. Introducción y Antecedentes

1.1 Antraquinonas: Breve descripción

Las quinonas (Figura 1.1a) son compuestos de gran importancia biológica con características únicas, están ampliamente distribuidas en la naturaleza incluyendo los tejidos de plantas y animales. En las enzimas respiratorias estas constituyen una parte de la cadena de transferencia electrónica [1], también están relacionadas con algunas vitaminas, como la vitamina K, que tiene un importante papel benéfico en la coagulación y crecimiento de los huesos [2, 3], la vitamina E, conocida también como α -Tocoferol la cuál es oxidada a tocoferil quinona durante el proceso de anti-oxidación [4], y tiene efectos protectivos contra el daño por especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente a estos papeles biológicos, las quinonas han sido usadas en una amplia variedad de práctica clínica y aplicaciones industriales. Por ejemplo, doxorubicina es una antraquinona que ha sido usado como antibiótico en tratamientos de tumores malignos [5]. Los derivados de 9,10 antracenediona se han implementado ampliamente en la terapia contra el cáncer como agentes intercaladores de ADN [6]. Se ha demostrado en muchos trabajos que las propiedades redox de las antraquinonas están relacionadas con sus propiedades ácido-base [7].

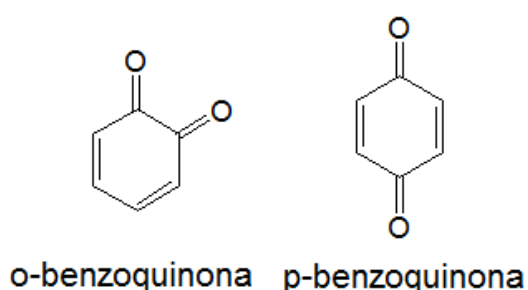


Figura 1.1a Estructuras de dos isómeros de quinona, orto- y para-benzoquinona

Las antraquinonas constituyen el mayor grupo de quinonas naturales y son bien conocidas por exhibir un amplio rango de actividades bioactivas tales como antimicrobial, antifúngica, hipotensora, analgésica y antimalaria [8]. Estos compuestos tienen muchas aplicaciones y se utilizan en medicamentos, en la

industria textil y alimentaria como colorantes [9]. Numerosas antraquinonas fueron aisladas de raíces de las plantas [10, 11]. Estas forman un grupo de compuestos aromáticos funcionalmente diversos, estructuralmente relacionadas con el antraceno, con la estructura base 9,10-dioxoantraceno como se muestra en la Figura 1.1b.

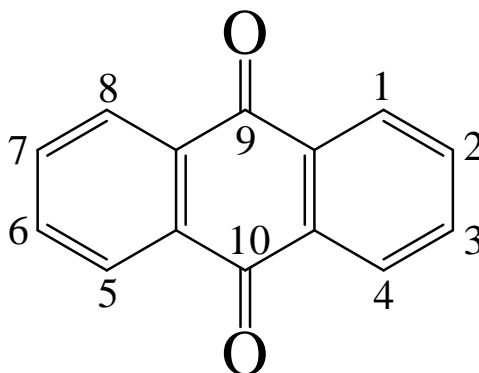


Figura 1.1b Estructura química de la antraquinona

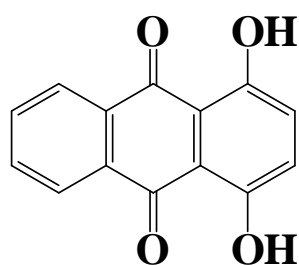
Las antraquinonas hidroxiladas son compuestos naturales y sintéticos que son ampliamente usados como fármacos, debido a que son biológicamente activas [12]. Además, presentan un importante papel en la cadena respiratoria de transporte de los electrones para mantener funciones biológicas de las plantas. Un estudio revela que la 9, 10 dihidroxi-antraquinona reduce la eficiencia fotosintética de bacterias e inclusiones celulares [13]. Estos compuestos son candidatos para la interacción con el ADN con efectos tanto positivos como negativos [14].

El análisis de antraquinonas naturales es de importancia en varios campos incluyendo la investigación de propiedades fisiológicas para evaluar sus efectos sobre la salud humana y monitoreo terapéutico [15].

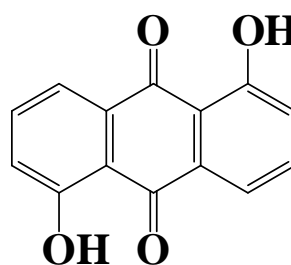
Se ha demostrado que las propiedades de las antraquinonas tienen una fuerte dependencia de sus propiedades ácido base, por lo que es de vital importancia el conocimiento de las constantes de acidez. El número de grupos fenólicos y la posición de estos grupos en las moléculas de las hidroxiantraquinonas determinan sus características ácido-base.

La habilidad de intercalación con el ADN depende de la presencia de grupos hidroxilos que son capaces de formar enlaces con las bases del ADN a través de enlaces de puente de hidrógeno [14]. La fuerza de enlace de hidrógeno como una interacción intermolecular desempeña un papel importante en muchos fenómenos químicos como la regulación de propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, solubilidad, densidad, actividad biológica, reactividad, solvatación, complejación y propiedades ácido-base) [16-19].

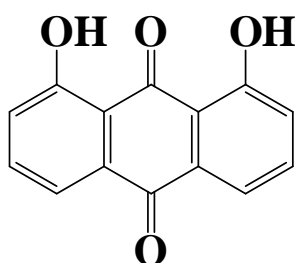
Algunos estudios muestran que el número y posición de sustituyentes tienen una significativa influencia en propiedades como las constantes de acidez, actividad antioxidante [20] y reactividad química, es por ello que se eligieron como grupo de estudio cuatro dihidroxi-antraquinonas: Antrarufina (1,5 dihidroxi-antraquinona), Antraflavina (2,6 dihidroxi-antraquinona), Crisazina (1,8 dihidroxi-antraquinona) y Quinizarina (1,4 dihidroxi-antraquinona) sus estructuras químicas se muestran en la Figura 1.1b.



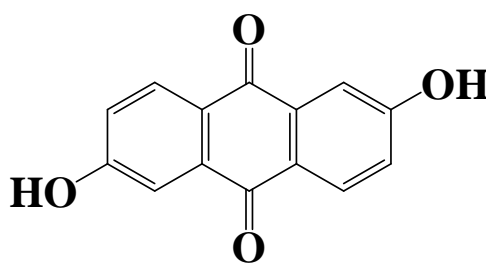
a) H₂Qz



b) H₂Arf



c) H₂Cz



d) H₂Afv

Figura 1.1b. Estructuras químicas de a) quinizarina, 2) antrarufina, 3) crisazina y 4) antraflavina

1.1.1 Quinizarina

Quinizarina (1,4 dihidroxi-antraquinona), se ha aislada e identificada de diferentes especies de plantas tales como la *Rubia Tinctorum* [21] y hojas de *Cassia tora* [22]. Esta dihidroxi-antraquinona tiene aplicaciones en el campo medicinal, demostrando efectos inhibitorios contra la bacteria intestinal (*Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*). Además, quinizarina exhibe efectos inhibitorios en la biotransformación de Aflatoxina B1 a los correspondientes a epóxidos 8-9, los cuales son responsables de los efectos tóxicos y carcinogénicos de aflotoxinas, metabolitos secundarios producidos primariamente por el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* [23, 24]. La 1,4-dihidroxiantraquinona ha recibido cierta atención como fármaco contra el cáncer [25, 26]. También se utiliza como fungicida y pesticida. Además, se encuentra en aplicaciones específicas como aditivo en lubricantes. La quinizarina forma complejos fluorescentes con litio, boro y aluminio que la hace útil para la detección espectrofluorimétrica de estos elementos [27, 28].

1.1.2 Antrarufina

La Antrarufina (1,5 dihidroxi-antraquinona) es una importante intermediaria para la fabricación de tintes azules dispersos y se obtiene por medio del ácido 1,5-antraquinona-disulfónico calentando con una suspensión acuosa de óxido de calcio y cloruro de magnesio bajo presión a 200-250 ° C [29].

La Antrarufina se encuentra en raíces de especies de *Rumex Crispus* [30], la cual es utilizada en Korea como medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de la piel, en enfermedades inflamatorias y actividad antioxidante [31, 32]. Se descubrió que la antrarufina es activa contra las bacterias grampositivas, así como también reduce los efectos dañinos de las dioxinas [33].

1.1.3 Crisazina

La molécula de Crisazina (1,8 dihidroxi-antraquinona), es utilizada en la fabricación de alizarina y es utilizada en medicamentos por sus propiedades laxantes, la crisazina se puede extraer de las hojas secas y los tallos de *Xyris semifasciata*, una planta cosechada en Madagascar. La crisazina también se usa ampliamente en algunas determinaciones de iones metálicos, por ejemplo, litio, magnesio, calcio, cobre, plomo, cadmio, zinc, níquel, manganeso, hierro, cobalto, paladio y platino [34].

1.1.4 Antraflavina

La molécula de Antraflavina (2,6 dihidroxi-antraquinona) es un potente inhibidor de la enzima citocromo P-448, la cual induce daños estructurales en el ADN [35, 36]. Este compuesto ha sido aislado de las raíces de *Rubia Tinctorum* [37] y de las hojas de *Casia Tora*, la cual presenta fuerte inhibición contra bacterias como *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* [38], se ha evaluado su eficiencia como agente antimalaria catalogando a Antraflavina con eficiencia media [39]

1.2 Constantes de acidez

La acidez de un compuesto está representada como K_a , la cual es un parámetro clave que define la forma o las formas del compuesto que se presentan bajo circunstancias específicas, son importantes en el entendimiento de la distribución, comportamiento de transporte y el mecanismo de acción de los principios activos de las formas farmacéuticas [40-42].

Para una reacción de disociación $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$, donde HA es el ácido que se disocia y A^- es la base conjugada del ácido, la constante de disociación se expresa como la razón entre las concentraciones (Ec. 1.2.1) que participan en el equilibrio.

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad \text{Ec. 1.2.1}$$

En general, el valor de K_a define la relación de la concentración de las formas polipróticas cargadas y no cargadas en un medio seleccionado. Debido a que los valores de K_a calculados en la práctica son de varios ordenes de magnitud, se suele utilizar el logaritmo de la constante de acidez (Ec.1.2.2).

$$pK_a = -\log_{10}K_a \quad \text{Ec.1.2.2}$$

Existen varias técnicas que han sido usadas para la determinación de los valores de pK_a entre las más usadas son potenciometría [43, 44], electroforesis capilar, espectroscopía [45-47], Resonancia magnética nuclear (RMN) [48].

Su eficiencia para la determinación de los valores de pK_a depende de la naturaleza química de los compuestos, su solubilidad y la estabilidad de las especies involucradas en las condiciones experimentales [49].

Uno de los métodos experimentales más utilizados es la espectrofotometría, la cual es una de las técnicas más empleadas para la investigación de equilibrio en solución, que permite el estudio de los equilibrios polipróticos [50]. Este método es ampliamente usado por su sencillez, requiere de un equipo relativamente accesible y se puede trabajar con la concentración de un compuesto en concentraciones micro molares [51]. Está basado en la medición de la absorción del espectro UV-Vis de mezclas a diferentes valores de pH, en el entorno del

valor de pK_a asumido. Como resultado se obtiene la dependencia de la absorbancia sobre una o varias longitudes de onda con respecto al valor de pH. El análisis de esta dependencia permite obtener el valor de pK_a . Además, los resultados obtenidos mediante esta técnica pueden ser refinados por medio de códigos computacionales tales como coeficientes de estabilidad para datos de absorbancia (SQUAD) [52].

Entre otros métodos de obtención de los valores de pK_a se encuentran los teóricos que son muy útiles cuando los intermediarios son de vida corta y para ácidos y bases muy fuertes o débiles [53].

1.2.1 Valores de pK_a reportados en la literatura

Realizando una búsqueda en la literatura se encontraron las constantes de acidez para quinizarina en mezclas orgánicas con diferentes técnicas las cuales se reportan en la Tabla 1.2.1. Barbosa y colaboradores [46] reportan dos valores de pK_a en metanol para antrarufina de 9.30 y 11.80, sin embargo, no se encontraron reportes de los valores de las constantes de acidez para crisazina y antraflavina. Los pocos estudios encontrados se llevaron a cabo en mezclas de compuestos orgánicos debido a la baja solubilidad en medio acuoso.

Tabla 1.2.1 Valores de pK_a experimentales de quinizarina reportados en la literatura

pK_{a1}	pK_{a2}	Medio	Técnica	Referencia
9.90 ± 0.10	12.80 ± 0.10	acetona- isopropanol	Radiólisis de pulso	[54]
10.96 ± 0.01	14.38 ± 0.02	Inmovilizada sobre películas de acetyl- celulosa	Espectroscopía UV-Vis	[55]
10.22 ± 0.02	13.40 ± 0.10	Mezcla etanol- agua al 50 %	Potenciometría y Espectroscopía UV-Vis	[56]
12.95 ± 0.03	15.96 ± 0.07	Alcohol isopropílico	Espectroscopía UV-Vis	[57]

1.3 Complejos de inclusión

La actividad biológica de las antraquinonas, las cuales han mostrado ser candidatas para la elaboración de fármacos anticancerígenos, se ha visto limitada por su baja solubilidad en medio acuoso. Para mejorar esa propiedad y la estabilidad química se utiliza la encapsulación de fármacos hidrofóbicos con ciclodextrinas (CDs).

En el campo de la química supramolecular y farmacéutica la encapsulación de compuestos químicos se lleva a cabo usando derivados de CDs, las cuales son oligómeros cíclicos no reductores que consisten en 6-8 monómeros de glucosas las cuales son capaces de capturar moléculas lipofílicas dentro de su cavidad para formar especies supramoleculares [58-60]. Las CDs son frecuentemente usadas por su buena solubilidad en agua, alta viabilidad y fácil funcionalización [61, 62]. Compuestos hidrofóbicos son encapsulados en la cavidad de las CDs para formar complejos de inclusión a través de interacciones no covalentes sin reacciones químicas complejas [63]. En general se ha demostrado que la formación del complejo proporciona modificaciones positivas en las propiedades de moléculas huésped. Por ejemplo, pueden mejorar la disolución de sustancias insolubles [64, 65], control de volatilidad [65, 66] y estabilización de compuestos inestables contra la luz y calor [67, 68].

Las moléculas encapsuladas, cuyas dimensiones son adecuadas, pueden interactuar y unirse a la cavidad de la ciclodextrina mediante la formación de complejos de inclusión [69-71]. El tamaño depende del número de unidades de monómeros, los miembros más comunes de esta familia son α -, β - y γ -CDs (Figura 1.3a) las cuales están constituidas por seis, siete y ocho unidades de D-glucopiranososa respectivamente. Modificaciones de la β -CD han sido sintetizadas, dado que la β -CD por sí misma presenta poca solubilidad en agua. Se propone el uso de 2-Hidroxi-propil β - ciclodextrina (2Hp β -CD) debido a que mostrado ser segura en aplicaciones de la industria alimenticia y cosmética [72-74].

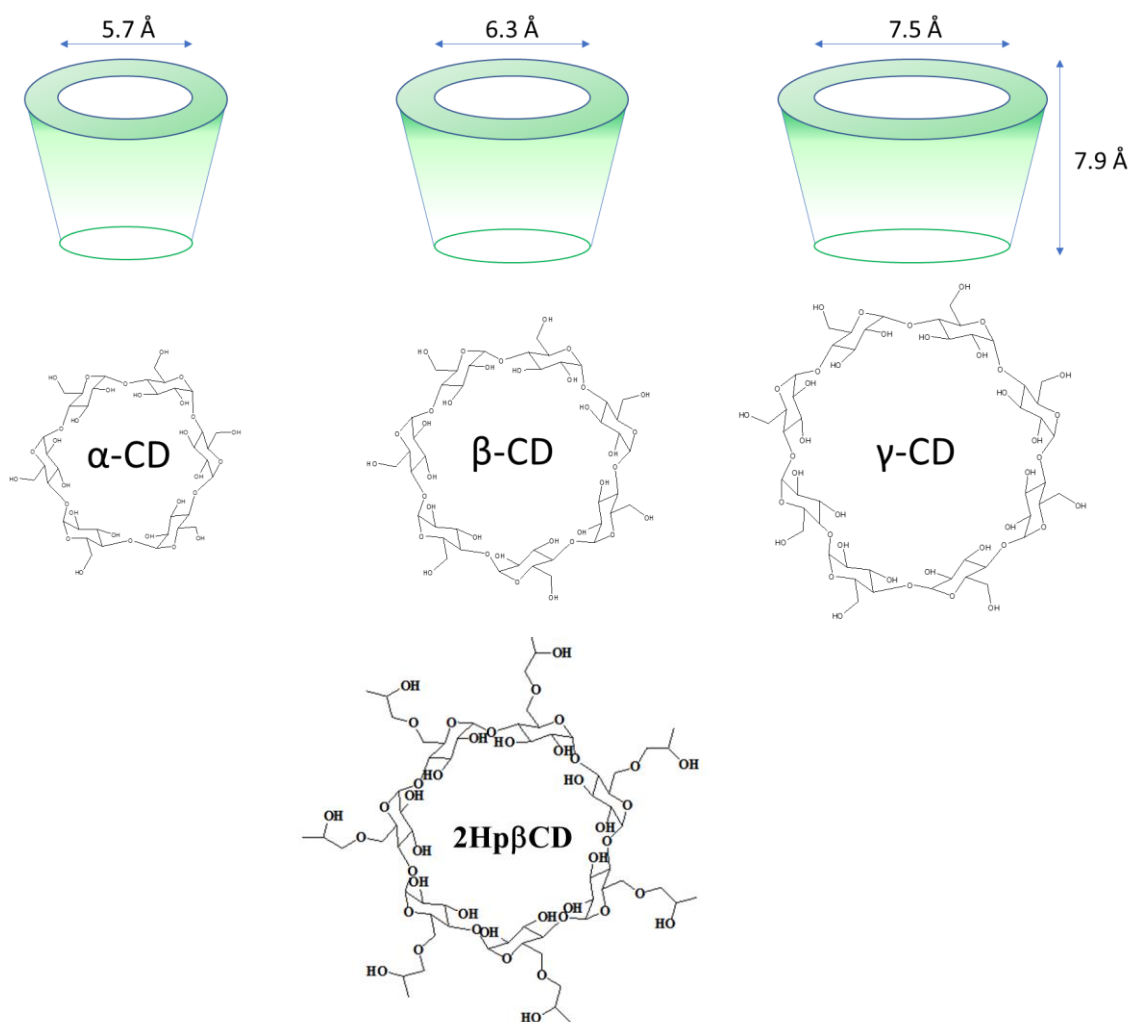


Figura 1.3a. Estructuras químicas de α -, β -, γ -CD y 2Hp β CD, representación de CD's en forma de cono truncado y sus dimensiones en Å.

El anillo de las dihidroxi-antraquinona sustituidas de Quinizarina tiene una dimensión de aproximadamente 6.3 Å donde el anillo aromático no sustituido tiene una dimensión aproximada de 5 Å. Se espera que Quinizarina entre en la cavidad de la β -CD dado que el diámetro interno de la cavidad es similar al ancho del anillo sustituido de Quinizarina, probablemente Quinizarina entra en la cavidad de lado del anillo no sustituido, de tal manera que el anillo quinoideo queda completamente dentro de la cavidad, proporcionando la máxima inclusión de Quinizarina en la cavidad de la β -CD, como se muestra en la Figura 1.3b.

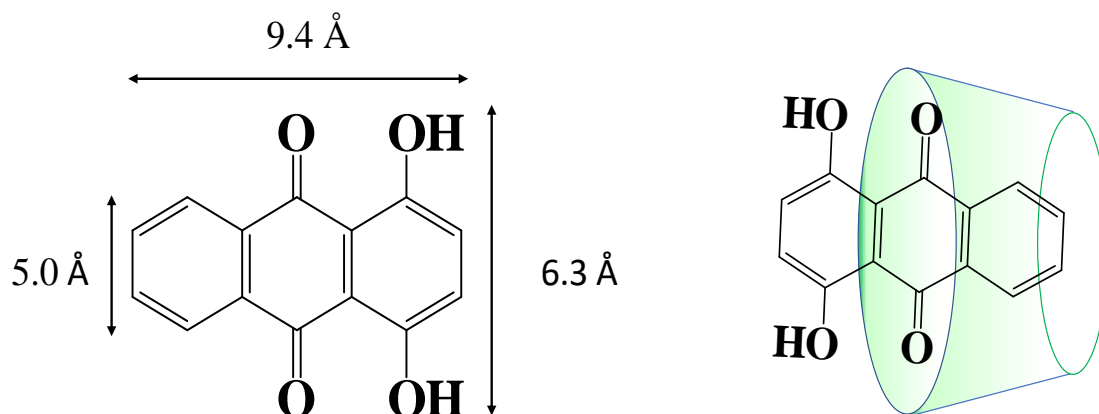


Figura 1.3b. Representación esquemática de Quinizarina con β -CD y dimensiones de quinizarina.

1.4 Actividad antioxidante

Se han reportado muchos compuestos con actividad antioxidante con núcleo antraquinóideo en su estructura, estos compuestos se han aislado de extractos de plantas y algunos de ellos obtenidos de forma sintética [75-78]. Las propiedades curativas de las plantas usadas en medicina tradicional, se asocian a la presencia de antraquinonas [79]. Debido al gran número de antraquinonas que contienen diferentes plantas no todas han sido examinadas, aunque todas las antraquinonas tienen la misma característica estructural no muestran la misma capacidad antioxidante, ya que los grupos sustituyentes ejercen un impacto diferente en la capacidad captadora de las moléculas individuales [80].

1.4.1 Métodos para determinar capacidad antioxidante

Se han desarrollado varios métodos diferentes para medir capacidad antioxidante, pero ninguno de ellos está exento de limitaciones [81-83]. Hasta ahora, muchos de estos métodos analíticos han sido desarrollados para la evaluación de propiedades antioxidantes de las plantas [84].

Los métodos analíticos basados en la desactivación de radicales están divididos en dos tipos, aquellos cuyos mecanismos son de transferencia de hidrógeno (HT) y transferencia electrónica (SET). Los resultados difieren en la cinética de la reacción y la aparición de reacciones secundarias. Las reacciones HT y SET están caracterizados por la estructura antioxidante y el valor de pH [85]. Aunque,

las ventajas y desventajas de métodos analíticos se han discutido muchas veces en la literatura, hasta ahora, ninguno de los métodos puede ser asignado como el más adecuado [86], es decir, no existe un método universal que pueda medir la capacidad antioxidante de forma muy precisa y cuantitativamente porque la estimación de la actividad antioxidante se ve muy afectada por la especies reactivas de Oxígeno (del inglés, Reactive Oxygen Species, ROS) o especies reactivas de nitrógeno (del inglés, Reactive Nitrogen Species, RNS) empleados en los ensayos, así como por las condiciones experimentales en las que se llevan a cabo estos ensayos, aunque se espera que la estructura química de la molécula antioxidante seleccionada determine principalmente su capacidad antioxidante [87].

Se ha demostrado que hay algunos métodos disponibles que dan lugar a resultados inconsistentes por la inadecuada interpretación de los resultados [88]. Por tanto, es importante emplear varios ensayos para determinar la capacidad antioxidante y caracterizar la naturaleza del antioxidante seleccionado.

Para la evaluación de la habilidad de capturar un radical o reducir un agente oxidante, los métodos basados en espectrofotometría son adecuados para monitorear la formación o la desaparición del radical de naturaleza cromogénica. Entre ellos se encuentran el ensayo con el radical \cdot DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazilo), ABTS (ácido 2, 2'-azino-bis, 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico), ORAC (por sus siglas en inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity) y FRAP (del inglés, Ferric Reducing Antioxidant Power). Como la presencia de polifenoles está relacionado con la habilidad de capturar radicales libres (RL) de vegetales y frutas, la determinación de polifenoles totales en una muestra, de un buen indicativo de la capacidad antioxidante de los alimentos.

Estos métodos son monitoreados por espectrofotometría y algunos de ellos son medidas directas de la capacidad antioxidante (ABTS y \cdot DPPH) debido a que están basados en la habilidad de reducir un complejo de Hierro (en el caso del ensayo FRAP), o para reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu (una mezcla de fosfomolibdato y fosfotugstenato), en la determinación de polifenoles [89-91].

Los métodos electroquímicos para evaluar capacidad antioxidante han surgido en la última década en base al hecho de que uno de los modos de acción de los antioxidantes es la capacidad de donar electrones [92].

En efecto, el uso de métodos electroquímicos presenta muchas ventajas tales como tiempo de detección corta, pequeño volumen de muestra, alta precisión, simplicidad y mínimas interferencias de muestras coloreadas evitando pretratamientos. En particular el uso de biosensores electroquímicos enzimáticos para la evaluación de la capacidad antioxidante es muy útil porque el principio de detección de los biosensores es más cercano a la actividad antioxidante en sistemas biológicos imitando el daño causado in vivo por ROS [93-95].

Los recientes avances en química computacional han hecho posible investigar el estudio de la interacción de intermediarios de vida media corta, incluyendo ROS [88, 96-98]. Sin embargo, la validación de los resultados teóricos en el caso de estudio de RL con intermediarios de tiempo de vida corto es una tarea difícil. Hoy en día no existe una metodología que refleje por completo la actividad antioxidante de un compuesto y por tal razón es necesario realizar comparaciones entre varios métodos. De este problema surge la necesidad de estandarizar un método que tome en cuenta aspectos que puedan influenciar en la actividad antioxidante y que incluyan todos los mecanismos y sitios de reacción.

Para resolver este problema la metodología QM-ORSA [88], un protocolo computacional disponible basado en química cuántica para la actividad captadora de RL, toma en cuenta todos esos aspectos e intenta proporcionar un único criterio considerando capacidad antioxidante primaria y está basada en consideraciones termodinámicas y cinéticas.

OBJETIVOS



CAPITULO 2. Objetivos

2.2 Objetivos general

Con base a la importancia que tienen las dihidroxi-antraquinonas en la industria cosmética y textil, y dado que presentan propiedades bioactivas, es relevante el conocimiento del comportamiento químico de estas estructuras. Debido a la poca información disponible de estas moléculas en medio acuoso se propone en este trabajo como objetivo general:

- Caracterizar algunas propiedades fisicoquímicas (constantes de acidez, actividad antioxidante y constantes de complejos de inclusión con 2Hp β CD) de las dihidroxi-antraquinonas (Quinizarina, Antrarufina, Crisazina y Antraflavina).

2.2 Objetivos particulares

Para cumplir con el objetivo general se requiere llevar a cabo estudios con espectroscopía UV-Vis, estudios electroquímicos y métodos basados en estructura electrónica. A continuación, se detallan los siguientes objetivos particulares:

- Estimar los valores de pK_a de las dihidroxi-antraquinonas por medio de una metodología basada en estructura electrónica empleada como primera revelación fisicoquímica.
- Estudiar y analizar la estabilidad de las dihidroxi-antraquinonas en medio acuoso a 25 °C.

OBJETIVOS

- Determinar espectroscópicamente (UV-Vis) las constantes de acidez de algunas dihidroxi-antraquinonas en medio acuoso con ayuda del programa SQUAD.
- Calcular las energías de enlace por puente de hidrógeno de las DHAQ por medio de QTAIM (método basado en estructura electrónica) y estudiar la relación entre la energía de enlace con la facilidad de desprotonación.
- Analizar el comportamiento espectrofotométrico de quinizarina con 2Hp β CD y calcular la constante de inclusión del complejo H₂Qz-2Hp β CD a pH 7.00.
- Analizar el comportamiento electroquímico del sistema H₂Qz-2Hp β CD a pH 7.00.
- Determinar la capacidad antioxidante por medio de espectroscopía UV-Vis, monitoreando la absorbancia de las dihidroxi-antraquinonas mediante la reacción con el radical \cdot DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo) usando Trolox como estándar.
- Determinar la capacidad antioxidante de las dihidroxi-antraquinonas en equivalentes Trolox por medio de biosensores enzimáticos amperométricos con Lacasa y Tirosinasa.
- Determinar la actividad antioxidante de las dihidroxi-antraquinonas con un protocolo basado en química cuántica (QM-ORSA) usando el radical \cdot OOH.

METODOLOGÍA



CAPITULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Reactivos

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada 18 MΩ cm. Las soluciones de las dihidroxi-antraquinonas se realizaron con reactivo analítico Sigma (98.0 %) y etanol (grado cromatográfico Merck). Se trabajó con ácido clorhídrico (Merck 1.19 g/ml, 37%) e hidróxido de sodio (Merck 99 %).

3.2 Mediciones de pH

Las lecturas de los pH se llevaron a cabo en potenciómetro Mettler Toledo MP230 acoplado a un electrodo de vidrio 5010T (en un intervalo de pH de 0-14).

3.3 Mediciones espectrofotométricas

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis usando celdas de cuarzo (1 cm de longitud de paso óptico).

3.3.1 Estudios de estabilidad

Se realizó monitoreo de la absorbancia con respecto al tiempo después de 6 horas de la preparación de cada muestra de DHAQ, en ausencia de luz y atmósfera de nitrógeno a 25 °C. Se llevó a cabo un análisis del porcentaje de descomposición de las muestras.

3.3.2 Determinación de las constantes de acidez

Se prepararon soluciones de antraquinonas dihidroxiladas (10 μM) para cada dihidroxi-antraquinona se consideraron 11 valores de pH para quinizarina (12.13-9.74), 13 valores de pH para antrarufina (12.45-11.37), 18 valores de pH para crisazina (12.54-8.67) y 19 valores de pH (10.88-7.92) para antraflavina. Con la finalidad de mantener la fuerza iónica constante el pH para cada solución preparada se ajustó con NaOH 0.04 M y HClO₄ 0.04 M y se realizaron correcciones por dilución.

Utilizando los espectros de absorción apropiados a diferentes valores de pH y la composición química de las soluciones se determinaron las constantes de acidez con el programa SQUAD [52].

3.3.3 Complejo de inclusión del sistema Quinizarina-2HpβCD

Para la determinación de la constante del complejo de inclusión de la molécula de quinizarina con 2HpβCD se varió la concentración de 2HpβCD de 0.66 a 11.73 mM (milimolar), manteniendo la concentración de quinizarina constante 57 μM. Se mantuvo la temperatura constante a 25 °C y el pH a 7.02. Cada cambio de concentración de 2HpβCD en la solución de quinizarina fue monitoreado mediante espectroscopia de absorción de UV-Vis. Para determinar la constante del complejo de formación se utilizaron los espectros de absorción obtenidos y se procesaron en SQUAD, para este caso en vez de seguir el valor de pH se siguió p2HpβCD.

3.3.4 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo con ·DPPH

Mediante espectroscopia UV-Vis se siguió la reacción del radical ·DPPH con la DHAQ obteniendo curvas de calibración en función de la absorbancia de ·DPPH, obtenidas de la adición de diferentes volúmenes de la solución diluida de Trolox con un ajuste de volumen de etanol a 1 mL y registrando la absorbancia a 514 nm para Trolox. Para las muestras de dihidroxi-antraquinonas (DHAQ) se ajustaron con etanol y con la solución de ·DPPH (10^{-3} M).

Se calcularon las pendientes de las muestras tomando dos puntos de la parte lineal de la curva, que corresponden a la absorbancia inicial del ·DPPH en solución y la absorbancia del ·DPPH después de la reacción con el antioxidante de prueba, esta diferencia se dividió entre la concentración inicial de la solución sin ·DPPH.

$$m_m = \frac{A_0 - A_{muestra}}{C_0} \quad \text{Ec.3.3.4a}$$

Para el cálculo del índice TEAC se divide la pendiente de la muestra (m_m) entre la pendiente de la curva con Trolox (m_T)

$$TEAC = \frac{m_m}{m_T} \quad \text{Ec. 3.3.4b}$$

El valor de TEAC consiste en comparar las pendientes entre la muestra y Trolox, si el valor obtenido es mayor a la unidad, el compuesto antioxidante presenta una mayor capacidad para capturar radicales libres con respecto a Trolox.

3.3.5 Cuantificación de Quinizarina mediante espectroscopia UV-Vis

La cuantificación espectrofotométrica de quinizarina en presencia de 2Hp β CD se llevó a cabo variando la concentración de quinizarina de 0 a 30 μ M, manteniendo la concentración de 2Hp β CD constante 10 mM, temperatura de 25 ° C y pH 7.02. Cada cambio de concentración de 2Hp β CD fue monitoreado mediante espectroscopia de UV-Vis.

3.4 Mediciones electroquímicas

Los experimentos electroquímicos fueron llevados a cabo con un potenciostato Épsilon Bas-I, usando una celda convencional de tres electrodos: un electrodo de pasta de Carbono (por sus siglas en inglés, carbon paste electrode, CPE), como electrodo de trabajo, un electrodo de Pt como electrodo auxiliar y el electrodo de referencia Ag/AgCl.

El CPE fue preparado en una relación 1:1 en peso de una mezcla de polvo de grafito (Johnson Matthey 1 μ M, 99.9%) y un aceite mineral (nujol) de Sigma-Aldrich.

Las soluciones para el estudio electroquímico fueron preparadas en 0.1 M de buffer de fosfatos ajustando a pH 7.02 bajo una atmósfera de Nitrógeno a temperatura constante de 25 °C. Las mediciones de Voltamperometría Cíclica se llevaron a cabo manteniendo el electrodo de trabajo inmerso en esa solución electrolítica con diferentes concentraciones de 2Hp β CD y quinizarina.

3.4.1 Cuantificación de quinizarina mediante VC

Los estudios con voltamperometría cíclica (VC) se llevaron a cabo con el electrodo de trabajo inmerso en un baño electrolítico con diferentes concentraciones de quinizarina, fijando la concentración de 2Hp β CD (p2Hp β CD = 2.1) y pH = 7.02 (ajustado a 0.1 M de Buffer de Fosfatos). De la gráfica de variación de corriente del pico anódico como función de la concentración de esos VCs, los parámetros analíticos fueron determinados: límites de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y sensibilidad.

3.4.2 Capacidad antioxidante mediante el uso de biosensores amperométricos

En este método, la enzima se deposita sobre el electrodo de trabajo en una mezcla formada por una solución de Lacasa 5 mg/mL. En una celda termoregulada a 30 °C bajo agitación se colocan 10 mL de buffer de acetatos 0.1 M (pH=4.70) y se sumerge el biosensor.

Las mediciones amperométricas se llevaron a cabo registrando los cambios de corriente en función de la concentración del sustrato a un potencial fijo. Las curvas de calibración se construyeron graficando la concentración total del sustrato y Trolox. El cociente entre el sustrato y Trolox proporcionan el valor de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

3.5 Detalles computacionales

Todos los cálculos electrónicos fueron realizados con el paquete de programas computacional Gaussian 09 [99]. El estudio se realizó utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), en particular la aproximación M06-2X [100] con el conjunto de funciones de base 6-311 ++ G (d, p) y el modelo de solvatación continuo basado en la densidad (SMD) [101]. El funcional M06-2X es un funcional de intercambio y correlación recomendado para cálculos de propiedades termoquímicas, cálculos de la energía de la barrera de reacción, estados excitados, interacciones no covalentes, cálculos de estructura molecular, y energías para metales de transición [102].

3.5.1 Cálculo de Energías de enlace

El análisis de parámetros topológicos se realizó con la finalidad de caracterizar las interacciones del enlace de hidrógeno, estos parámetros fueron calculados con el programa AIM2000 [103], el cual permite visualizar los gráficos moleculares señalando los puntos críticos de enlace y puntos críticos de anillo. A partir de los parámetros topológicos se calcularon las energías de enlace con los enfoques de Mata, Espinosa y Afonin.

3.5.2 Estimación de los valores de pK_a usando Parámetros Ajustados (PA)

La estimación de los valores de pK_a se efectuó por medio de una metodología de parámetros ajustados que consiste en calcular las diferencias de energía libres de Gibbs de cada compuesto y su base conjugada. Los parámetros ajustados para el nivel de teoría M06-2X y el conjunto de base 6-311 + G (d, p) corresponden a $m=0.318$ y $C_0=-82$. La expresión para el cálculo de pK_a es la siguiente:

$$pK_a = m\Delta G_{s(BA)} + C_0 \quad \text{Ec. 3.5.2}$$

3.5.3 Protocolo QM-ORSA

Para la estimación de la actividad antioxidante se utilizó la metodología conocida como QM-ORSA (Quantum Mechanics based test for Overall free Radical Scavenging Activity) [88]. Esta metodología está basada en consideraciones termodinámicas y cinéticas e incluye todos los posibles mecanismos y sitios de reacción tomando en cuenta el pH y la polaridad del medio.

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

Además, se estudian todos los sitios posibles de reacción. Esto permite identificar los sitios y mecanismos de reacción más importantes en la actividad antioxidante de compuestos químicos, así como los productos de reacción más probables. Esta metodología permite estimar separadamente la actividad

antioxidante en medio polar y no polar, correspondientes a fases acuosas y lipídicas en organismos vivos. Con este protocolo se obtienen dos escalas diferentes de cuantificación, una absoluta basada en constantes de velocidad globales, y una relativa usando Trolox como referencia.

El protocolo QM-ORSA se basa en los siguientes puntos:

- a) Usar siempre el mismo método de cálculo. Se recomiendan funcionales con buen desempeño para el cálculo de las energías de activación (por ejemplo, LC- ω PBE, M06-2X, BMK, B2PLYP, M05-2X, y MN12SX) en combinación con conjuntos de funciones de base en el rango 6-31+G(d) a 6-311++G (d, p) o mayores y con el modelo de solvatación continuo SMD.
- b) Considerar todos los mecanismos y sitios de reacción.
- c) Modelar las reacciones con el mismo radical libre. Se recomienda el uso del radical $\cdot\text{OOH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ porque están presente en el organismo, son de reactividad intermedia y se conoce la rapidez con que reacciona con blancos biológicos.
- d) Emplear la teoría del estado de transición (TST) para constantes de velocidad [81].

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT} \quad \text{Ec.3.5a}$$

Donde k_B y h son las constantes de Boltzman y Planck, ΔG^\ddagger es la energía libre de activación, σ es la degeneración de caminos de reacción y κ la corrección de tunelaje.

- a) Usar la teoría de Marcus [104] para calcular las barreras de reacción de transferencia electrónica. En esta teoría la barrera de activación (ΔG_{ET}^\ddagger) se obtiene como:

$$b) \Delta G_{ET}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{ET}^0}{\lambda} \right)^2 \quad \text{Ec.3.5b}$$

donde ΔG_{ET}^0 es la energía libre de reacción y λ la energía de reorganización nuclear.

- c) Incluir la degeneración de caminos de reacción.
- d) Incluir correcciones de tunelaje.
- e) Usar estado estándar 1 M.
- f) Tener en cuenta el efecto caja del solvente.
- g) Incluir correcciones para reacciones controladas por difusión.
- h) Calcular los coeficientes de velocidad totales (suma de todos los caminos para las diferentes especies que contribuyen a la reactividad global).
- i) Calcular coeficientes de velocidad globales al pH de interés, utilizando fracciones molares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de estabilidad de DHAQ

Los estudios de estabilidad son una herramienta indispensable que permite garantizar la capacidad que tiene un compuesto de conservar sus propiedades físicas y químicas dentro de condiciones específicas. Factores como la temperatura, la luz, humedad y la presencia de oxígeno son las causas más frecuentes que alteran la estabilidad de los compuestos.

Con el fin de garantizar la integridad física de las moléculas de DHAQ durante el experimento, se realizó un estudio de estabilidad manteniendo la temperatura en 25 °C, en ausencia de luz y en atmósfera de nitrógeno durante 6 horas después de su preparación. Las DHAQ en medio acuoso presentan poca solubilidad por lo que se disolvieron en agua caliente agregando NaOH 1 M, sin embargo, en medio ácido las DHAQ son menos solubles dando lugar a la aparición de partículas de precipitado.

El porcentaje de degradación de un colorante (% D) indica la fracción mol de cada compuesto que se descompone o reacciona en condiciones específicas. En la Figura 4.1 se reporta el porcentaje de degradación, % D, tomando en cuenta sus máximos de absorción (Anexo A),

La absorbancia inicial y la absorbancia medida cada hora, en un intervalo de 6 horas después de su preparación se calculó conforme a la ecuación 4.1.

$$\%D = \left(1 - \frac{A^t}{A^{t_i}}\right) \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde A^t es la absorbancia en el tiempo y A^{t_i} es la absorbancia inicial en el tiempo 0 a longitudes de onda característicos

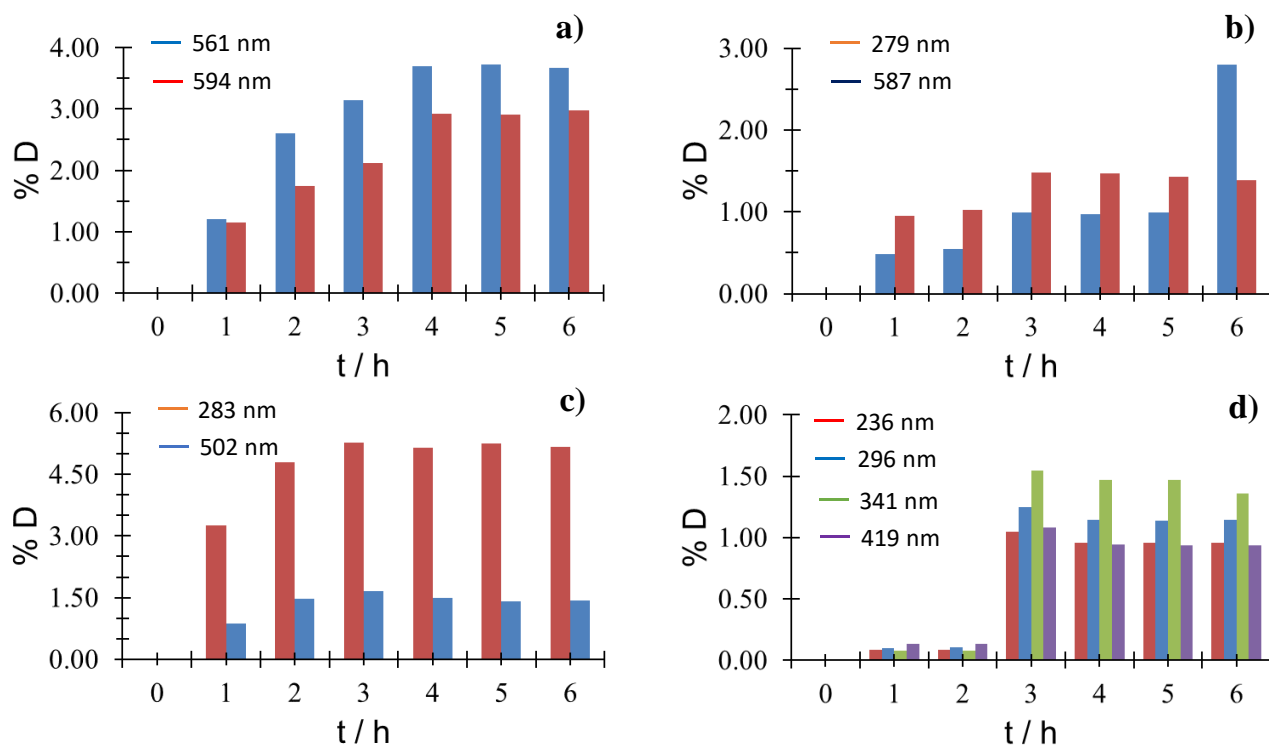


Figura 4.1 Comportamiento del %D en el tiempo a longitudes de onda características de a) quinizarina, b) antrarufina, c) crisazina y d) antraflavina

Los resultados del %D al pasar 6 horas después de su preparación a longitudes de onda características mostraron un porcentaje menor al 6 % en todos los casos, se observa un aumento gradual del porcentaje al pasar 3 horas después de su preparación, en las siguientes horas el %D parece mantenerse constante. Este comportamiento en el intervalo de medición sugiere que hay una conservación química de las moléculas de DHAQ sin modificación significativa.

4.1.1 Conclusiones parciales

De los estudios de estabilidad podemos ver que, en el periodo de trabajo de 6 horas, la integridad química de las DHAQ se conserva, siempre y cuando se mantenga la temperatura a 25 ° C, en ausencia de luz y en atmósfera de nitrógeno.

4.2 Propiedades electrónicas de la DHAQ

Se han llevado a cabo estudios experimentales de las propiedades electrónicas de las Antraquinonas incluyendo los efectos del solvente [105, 106]. En estos estudios se muestra que las Antraquinonas absorben en 220-350 nm, con bandas dominantes de transiciones π - π^* , transiciones de bandas más débiles (energías más bajas 400 nm aproximadamente) pueden ser atribuidas a transiciones tipo n - π^* . La sustitución de grupos con pares de electrones no compartidos como el grupo OH modifica la intensidad del color de la absorción, desplazando el máximo de absorción a mayores longitudes de onda.

En las siguientes figuras se muestran los gráficos de la absorbancia de cada DHAQ en función de las longitudes de onda (nm) que muestran el comportamiento de las bandas de absorción en la región UV-Vis a diferentes valores de pH.

Los espectros de absorción de H₂Qz (71 μ M) muestran una fuerte absorción en 559 y 593 nm (Figura 4.2a), a medida que disminuye el valor de pH la banda del máximo de absorción decrece y se desplaza hacia longitudes de onda menores. Cuando incrementa la basicidad del medio se aprecian un punto isobéptico, el cual se relaciona a por lo menos un equilibrio de disociación, este punto se localiza en 401 nm.

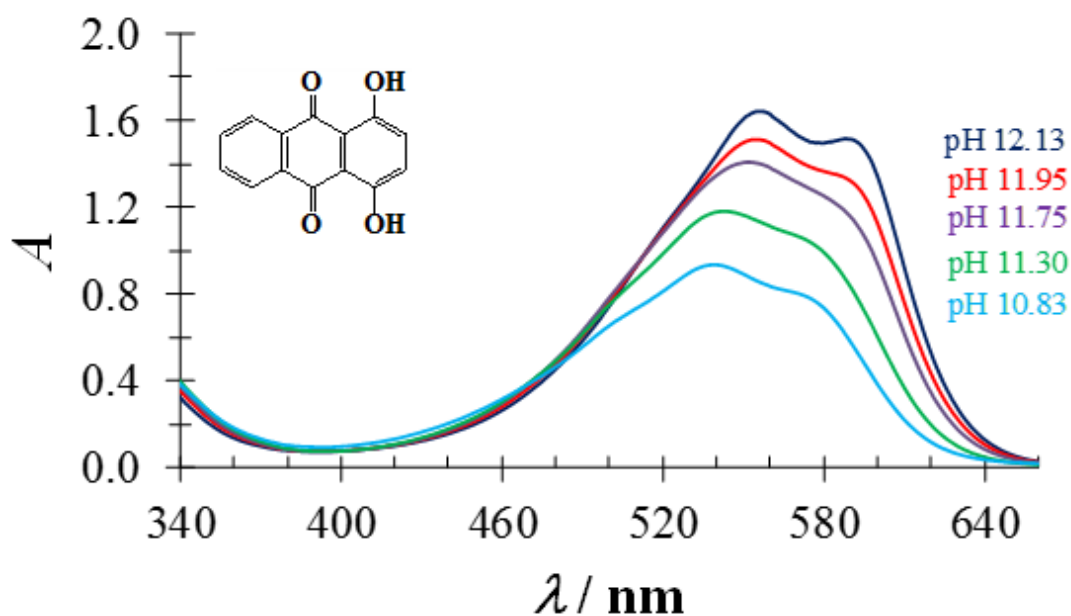


Figura 4.2a. Familia de espectros de H₂Qz (71 μM) en medio acuoso en un intervalo de 12.13 > pH > 10.83

La Figura 4.2b muestra la familia de espectros de absorción de H₂Arf (2.4 μM) en medio acuoso, donde se observa un máximo de absorción en 484 nm al disminuir el valor de pH se desplaza el máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores. Dos puntos isobéuticos se observan en 404 y 540 nm respectivamente.

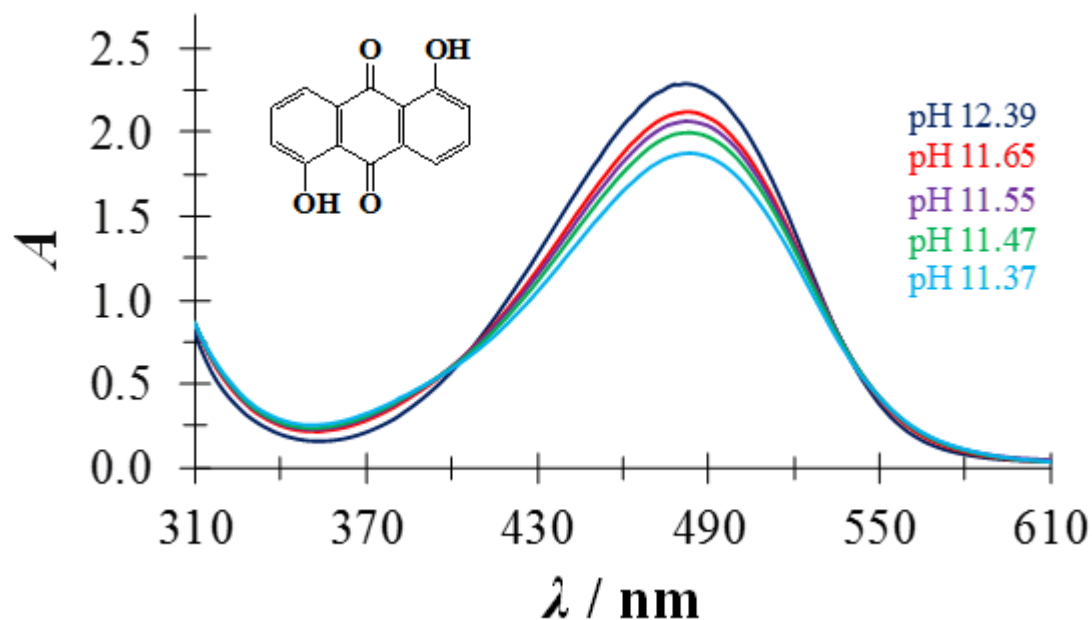


Figura 4.2b. Familia de espectros de H₂Arf (2.4 μM) en medio acuoso en un intervalo de 12.39 > pH > 11.37

Los espectros de absorción de H₂Cz (79 μM) presentan dos máximos de absorción en 438 nm y 516 nm este último presenta un efecto hipercrómico al aumentar la basicidad del medio y se observa un punto isobéptico localizado en 461 nm.

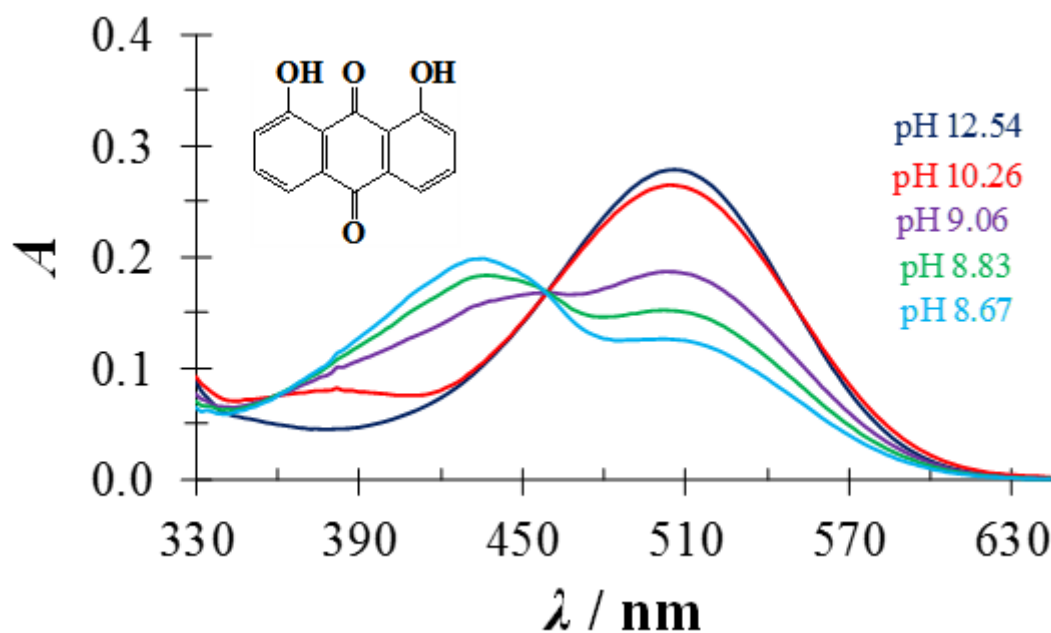


Figura 4.2c. Familia de espectros de H₂Cz (79 μM) en medio acuoso en un intervalo de 12.54 > pH > 8.67

Los espectros de absorción H_2A_{fv} cuyos máximos se encuentran localizados en 234, 294, 340 y 416 nm respectivamente, al aumentar el valor de pH se observa un incremento en el máximo de absorción. El espectro de absorción de antraflavina presenta al menos cinco puntos isobéuticos localizados en 250, 278, 302, 356 y 372 nm respectivamente. El aumento en el número de bandas de absorción con respecto a las demás DHAQ sugiere que se deben a efectos en la conjugación por deslocalización electrónica.

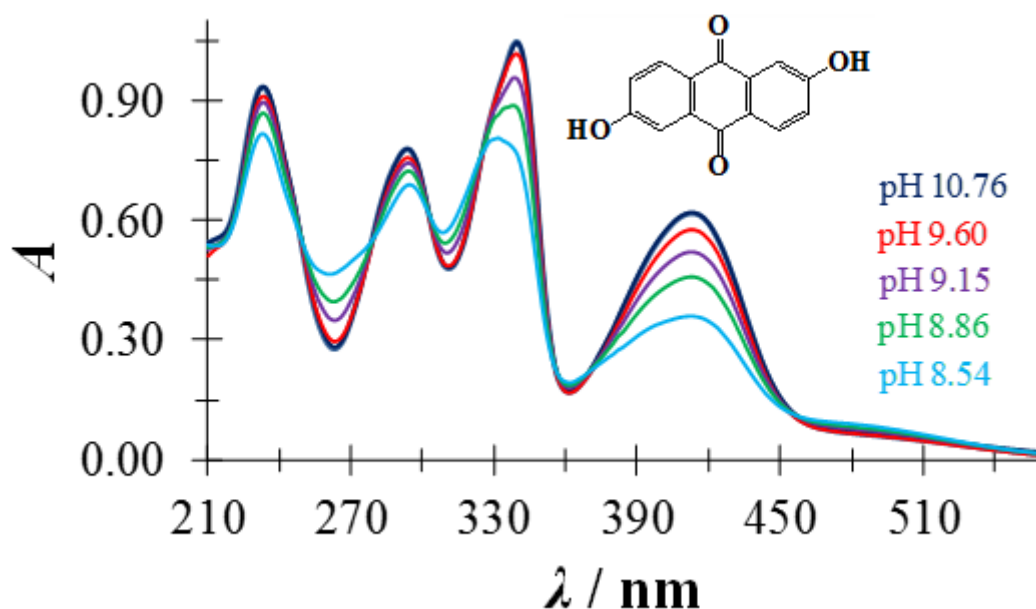


Figura 4.2d. Familia de espectros de H_2A_{fv} ($35 \mu M$) en medio acuoso en un intervalo de $10.76 > pH > 8.54$

4.2.1 Conclusiones parciales

De la determinación espectrofotométrica se observó que la sustitución del grupo OH en diferentes sitios de las DHAQ mostró un efecto diferente en los espectros de absorción, caracterizados por los desplazamientos o aumento de las bandas de absorción debido a la influencia de enlaces de hidrógeno, los efectos electrónicos y estéricos.

4.3 Estimaciones de la constante de acidez por medio de Parámetros Ajustados (PA)

Los métodos computacionales ofrecen una herramienta útil para el análisis y el cálculo de las constantes de acidez, en este caso en particular donde se desconocen los valores de pK_a de las DHAQ en medio acuoso, un enfoque teórico basado en la determinación de parámetros empíricamente ajustados propone una opción para la aproximación de estos valores [107].

El método de PA consiste en obtener la energía libre de Gibbs de cada compuesto y de su base conjugada. El cálculo de los valores de pK_a depende del grupo funcional donde se encuentra el protón ionizable, en el caso de DHAQ se clasifica en fenoles, donde se incluyen dos parámetros empíricamente ajustados que dependen del tipo de método y el conjunto de base empleado.

El cálculo se llevó a cabo a nivel de teoría M06-2X con un conjunto de base 6-311+ G (d, p) para los cuales los valores de los dos parámetros corresponden a $m= 0.32$ y $C_0=-82.21$ (Figura 4.3) [107]. Se calcularon los valores de pK_a de DHAQ de acuerdo con el modelo representado en la Ec. 4.3.1

$$pK_a = m\Delta G_{S(BA)} + C_0 \quad \text{Ec.4.3.1}$$

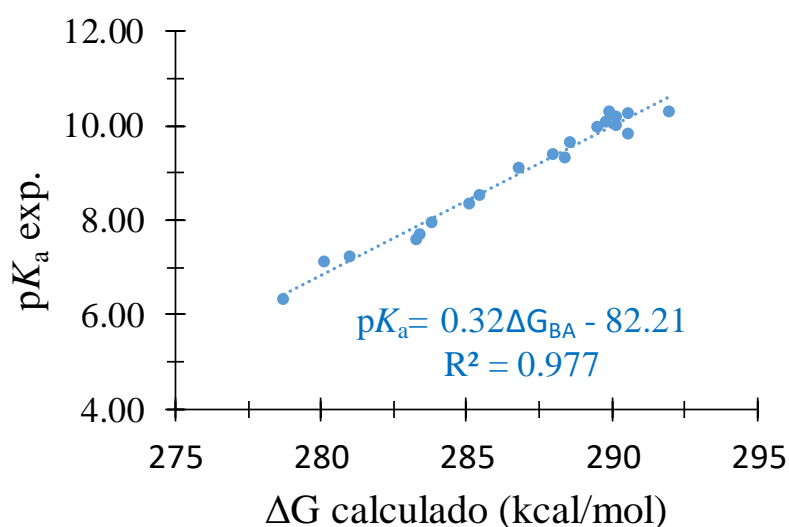


Figura 4.3 Gráfico de los valores de pK_a experimentales en función de ΔG en kcal/mol calculados con el funcional M06-2X y el conjunto de funciones de base 6-311 + G (d, p) en medio acuoso con el modelo del solvente SMD para la familia de fenoles [107]

Para moléculas simétricas, como las dihidroxi-antraquinonas, se agregó una corrección al valor de $\Delta G_{S(BA)}$ de 0.41 kcal/mol. En la Tabla 4.3 se reportan los valores de pK_a calculados por medio del método PA.

De la figura 1.1b se muestran las estructuras de las DHAQ las cuales poseen dos protones ionizables en diferentes posiciones. En principio, esto implica que las dos constantes de acidez estimadas mediante el método PA se pueden discernir y están asociadas con dos equilibrios ácido-base descritos en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Equilibrios de disociación de DHAQ y valores de pK_a con método PA

<i>Equilibrios de formación global de DHAQ</i>	pK_a (PA)
$H_2Qz = H^+ + HQz^-$	8.68
$HQz^- = H^+ + Qz^{2-}$	10.25
$H_2Arf = H^+ + HArf^-$	7.34
$HArf^- = H^+ + Arf^{2-}$	10.55
$H_2Cz = H^+ + HCz^-$	8.42
$HCz^- = H^+ + Cz^{2-}$	10.61
$H_2Afv = H^+ + HAvf^-$	7.27
$HAvf^- = H^+ + Afv^{2-}$	8.06

Los valores más bajos para la primera y segunda desprotonación se observan para para antraflavina (Tabla 4.3), un aumento de los valores de pK_a se observó para el resto de las DHAQ estudiadas las cuales presentan interacción por enlace por puente de hidrógeno. El error absoluto asociado a este tipo de cálculo para una familia de fenoles sustituidos, depende del tipo de método y base empleado y varía entre 2 y 3.6 unidades de pK_a [108]. Los valores calculados de pK_a fueron utilizados junto con la información recopilada de los espectros de absorción UV-Vis para determinar las constantes de acidez experimentales.

4.3.1 Conclusiones parciales

La estimación de los valores de pK_a por PA se llevó a cabo como primera revelación fisicoquímica de las DHAQ en medio acuoso. Los valores de pK_a más bajos se observaron para antraflavina lo que se asocia a la ausencia de la formación de enlaces por puente de hidrógeno intramolecular.

4.4 Constantes de acidez experimentales

Los cambios registrados en la absorbancia al variar el valor de pH a diferentes longitudes de onda (en múltiplos de 2 nm), un modelo químico y la propuesta de un valor inicial estimado de la constante de acidez fueron alimentados como datos de entrada al programa SQUAD [52], el cual a través de un método iterativo determinó las constantes de acidez (Anexo B).

Los valores de pH considerados para la determinación de las constantes fueron: 11 valores para quinizarina en el intervalo de pH de 12.13-9.74, 13 valores de pH para antrarfina (12.45-11.37), 18 valores de pH para crisazina (12.54-8.67) y 19 para antraflavina (10.88-7.92).

En la Tabla 4.4a se presentan los equilibrios químicos de formación y de disociación, así como sus respectivas constantes de formación (β) y constantes de acidez (pK_a). La desviación estándar total σ_T y la suma de mínimos cuadrados U son parámetros estadísticos que son considerados como criterios de una buena estimación a los valores calculados de pK_a .

Tabla 4.4a. Constantes de formación global (β), valores de pK_a calculados a partir de datos de absorbancia recopilados del estudio experimental por medio de espectrofotometría UV-Vis.

Equilibrio de formación global	Log β	$10^3 \sigma_T$	$10^3 U$	Equilibrio de disociación	pK_a
$Qz^{2-} + H^+ = HQz^-$	12.03	1.80	2.60	$H_2Qz^- = HQz^- + H^+$	10.83 ± 0.03
$Qz^{2-} + 2H^+ = H_2Qz$	22.86			$HQz^- = Qz^- + H^+$	12.03 ± 0.03
$Arf^{2-} + H^+ = HArf^-$	12.49	4.91	0.33	$H_2Arf^- = HArf^- + H^+$	10.93 ± 0.02
$Arf^{2-} + 2H^+ = H_2Arf$	23.42			$HArf^- = Arf^- + H^+$	12.49 ± 0.02
$Cz^{2-} + H^+ = HCz^-$	12.37	0.79	1.49	$H_2Cz^- = HCz^- + H^+$	8.73 ± 0.01
$Cz^{2-} + 2H^+ = H_2Cz$	21.10			$HCz^- = Cz^- + H^+$	12.37 ± 0.01
$Afv^{2-} + H^+ = HAvf^-$	8.48	3.95	0.49	$H_2Avf^- = HAvf^- + H^+$	7.47 ± 0.03
$Afv^{2-} + 2H^+ = H_2Avf$	15.95			$HAvf^- = Avf^- + H^+$	8.48 ± 0.03

* σ_T es la desviación estándar total y U es la suma de mínimos cuadrados

De acuerdo con los valores de pK_a reportados en la Tabla 4.4a la diferencia más notable se observa para Antraflavina, la cual no presenta interacción por formación de puentes de hidrógeno. El incremento de los valores de pK_a en las

DHAQ estudiadas se asocia a la doble formación del enlace por puente de hidrógeno.

Comparando los valores de pK_a calculados con el método PA y los determinados experimentalmente se observan diferencias menores de 0.5 unidades de pK_a en el caso de Antraflavina, las diferencias más notables se encuentran en las moléculas de quinizarina y antrarufina mostrando una discrepancia con los valores experimentales de entre 1.78 y 3.59 unidades de pK_a , Cunningham y colaboradores [108] reportaron errores absolutos en un intervalo de hasta 3.6 unidades pK_a para la familia de fenoles, ellos proponen usar moléculas de agua explícitas para mejorar este tipo de estimación usando el modelo de solvatación continuo COSMO [109] (por sus siglas en inglés, Conductor Like Screen Model) ya que se adapta mejor en la descripción de la interacción por enlaces de hidrógeno.

Tabla 4.4b Errores absolutos de los valores de pK_a experimentales y los estimados con PA

<i>Equilibrio de disociación</i>	pK_a experimental	pK_a PA	Error absoluto
$H_2Qz^- = HQz^- + H^+$	10.83	8.68	2.15
$HQz^- = Qz^{2-} + H^+$	12.03	10.25	1.78
$H_2Arf^- = HArf^- + H^+$	10.93	7.34	3.59
$HArf^- = Arf^{2-} + H^+$	12.49	10.55	1.94
$H_2Cz^- = HCz^- + H^+$	8.73	8.42	0.31
$HCz^- = Cz^{2-} + H^+$	12.37	10.61	1.76
$H_2Afv^- = HAfv^- + H^+$	7.47	7.27	0.20
$HAfv^- = Afv^{2-} + H^+$	8.48	8.06	0.42

De los valores reportados en la Tabla 4.4a, se construyó el diagrama de zonas de predominio para las especies H_2Qz el cual fue realizado de acuerdo con Rojas y González [110, 111], ver Figura 4.4a. Es posible apreciar que para $pH \leq 10.83$ la especie neutra (H_2Qz) predomina, en el intervalo de $10.83 \leq pH \leq 12.03$ la especie aniónica (HQz^-) predomina y para $pH \geq 12.03$ la especie dianiónica (Qz^{2-}) es la predominante.

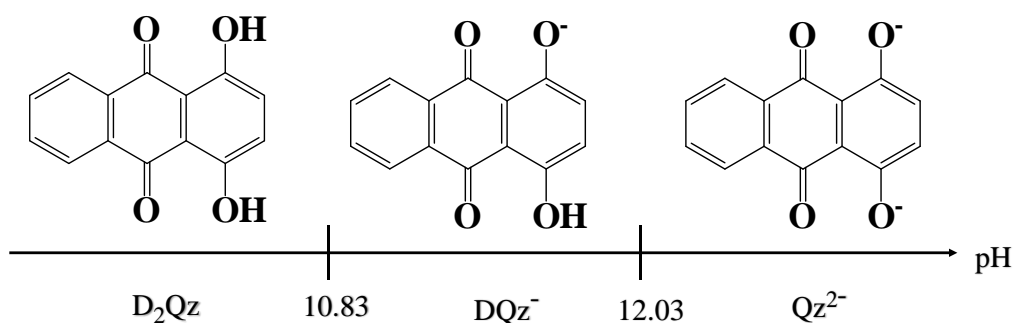


Figura 4.4a Diagrama de zona de predominio unidimensional para especies de H_2Qz como función de pH, contruidos a partir de las constantes de acidez reportadas en la Tabla 4.4a.

Una aplicación a los valores de pKa para un compuesto que presenta varios protones ácidos es la construcción de un diagrama de distribución de especies [111], el cual permite visualizar la especie predominante a un valor de pH dado. Los valores de pKa están representados en la Figura 4.4b, este diagrama muestra la distribución de las especies de las DHAQ y su zona de predominio en función del valor de pH. Este tipo de gráfico permite calcular las fracciones de las especies involucradas en el equilibrio a un valor de pH deseado.

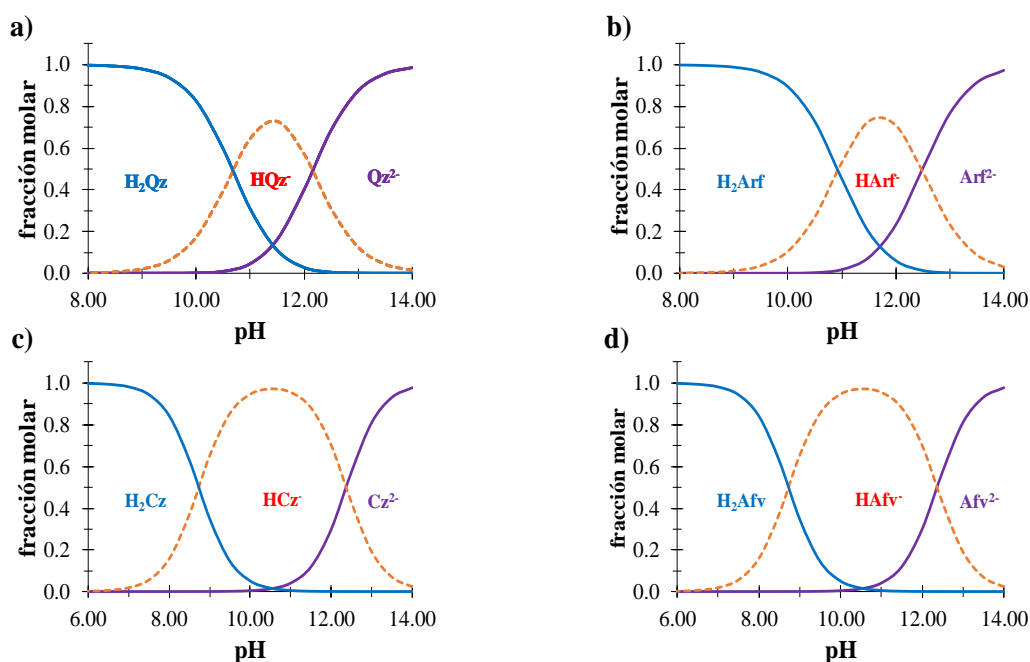


Figura 4.4b. Diagrama de distribución de especies en función del valor de pH de a) quinizarina b) antrurufina, c) crisazina y d) antraflavina usando los valores de pKa reportados en la Tabla 4.4

A partir de las constantes de formación global (β) y los coeficientes de absorptividad molar a cada longitud de onda propuestos por SQUAD (ver anexo C), la ley de Beer-Lambert y la ley de aditividad de la absorbancia, es posible calcular los espectros teóricos (representados por líneas) los cuales fueron comparados con los espectros de absorción obtenidos de forma experimental (representados por puntos) a diferentes valores de pH (Figura 4.4c), observándose que las bandas de ambos espectros presentan similitud en todos los casos lo que apoya la fiabilidad del método de determinación de constantes de acidez.

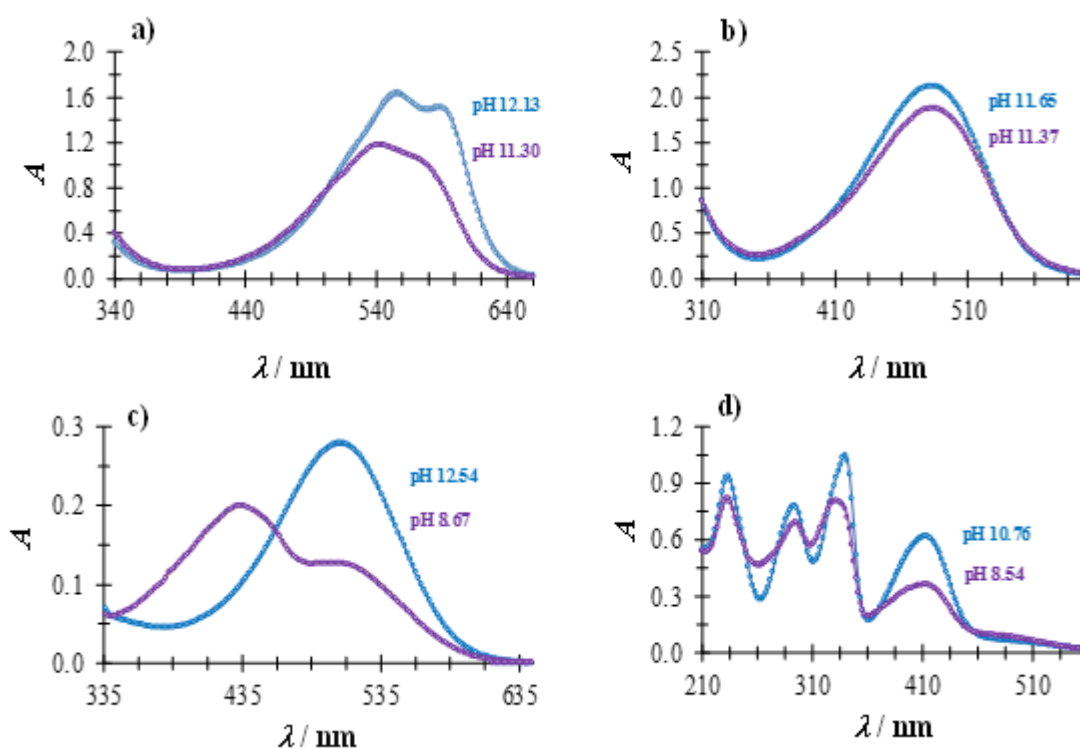


Figura 4.4c Comparación de los espectros de absorción experimentales (marcadores) y espectros teóricos (líneas) obtenidos a partir de los coeficientes de absorptividad molar y los valores de pK_a reportados en la Tabla 4.4a

4.4.1 Conclusiones parciales

A partir de los parámetros estadísticos y del ajuste de los espectros de absorción se comprobó que los valores determinados con SQUAD son confiables.

Los valores de pK_a en la determinación arrojan valores más bajos para antraflavina con respecto al resto de las DHAQ de estudio, este resultado

concordó con la estimación por PA dando errores absolutos menores a 0.5. La presencia del enlace intramolecular en las demás dihidroxi-antraquinonas resulta en un aumento de los valores de pK_a que el método de PA no estima adecuadamente.

4.5 Análisis topológico, energía de enlace de hidrógeno (E_{HB}) y relación con valores de pK_a experimentales

En esta sección se presenta un estudio del cálculo de las E_{HB} de hidrógeno con el fin de averiguar si estas se relacionan con la facilidad de desprotonación de las DHAQ.

Tres de las moléculas de las DHAQ de estudio presentan interacción intramolecular, estas involucran el átomo de hidrógeno del grupo OH fenólico y el átomo de Oxígeno en los grupos oxo en los sitios 9 y 10. La presencia de esas interacciones se confirmó por medio del análisis de Bader, el cual corresponde a la teoría QTAIM (del inglés, Quantum theory of atoms in molecules) y está basada en la densidad electrónica $\rho(r)$ y su Laplaciano $\nabla^2\rho(r)$ [112-116]. Los puntos críticos de enlace fueron identificados (por sus siglas en inglés, Bond critical points BCP) para quinizarina, antrarufina y crisazina (Figura 4.5a) y fueron caracterizados por el valor de dos magnitudes reportadas en la Tabla 4.5a.

Tabla 4.5a. Parámetros topológicos característicos de los puntos críticos

DHAQ	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$
Quinizarina	0.0426	0.0364
Antrarufina	0.0419	0.0360
Crisazina	0.0412	0.0364

Se ha demostrado que las interacciones de enlace de hidrógeno corresponden a los puntos BCP y que los parámetros $\rho(r)$, $\nabla^2\rho(r)$, la energía potencial local (V) y la densidad de la energía cinética (G), dependen de la geometría del enlace de hidrógeno [117, 118]. Además esta dependencia es similar entre la energía de enlace de hidrógeno (E_{HB}) y sus parámetros geométricos [119, 120]. Esta similitud ha motivado a investigadores a indagar relaciones entre la energía asociada de los enlaces de hidrógeno y sus parámetros topológicos en el correspondiente BCP.

Espinosa y colaboradores [120] establecieron que tanto la E_{HB} como V dependen de forma exponencial con parámetros geométricos. En esas ecuaciones el término exponencial es casi idéntico, sin embargo, los multiplicadores pre-exponenciales difieren dos veces. Basado en esta investigación, una relación lineal simple entre los valores de E_{HB} y V (en kcal/mol) con un coeficiente angular de 0.5 dada por la Ec. 4.5.1

$$E_{HB} = 0.5 V(r_{pc}) \quad \text{Ec. 4.5.1}$$

Debido a su simplicidad, la ecuación de Espinosa es frecuentemente usada para estimaciones de energía.

Donde:

$$V(r_{pc}) = \frac{1}{4} \nabla^2 \rho(r_{pc}) - 2G(r_{pc}) \quad \text{Ec. 4.5.2}$$

Y G se obtiene como:

$$G(r_{pc}) = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{\frac{2}{3}} \rho(r_{pc})^{5/3} + \frac{1}{6} \nabla^2 \rho(r_{pc}) \quad \text{Ec. 4.5.3}$$

Mata y colaboradores [118] subsecuentemente sugirieron que un valor preciso para la densidad de energía cinética puede ser encontrado.

$$E_{HB} = 0.429G(r_{pc}) \quad \text{Ec.4.5.4}$$

Una modificación a la ecuación de Espinosa (Ec. 4.3.1) se llevó a cabo [121] y se encontró que E_{HB} tiene una dependencia lineal con valores calculados de ρ y de V en un punto crítico de los correspondientes enlaces de hidrógeno (Enfoque de Afonin), estas ecuaciones se muestran a continuación.

$$E_{HB} = 0.277|V| - 0.45 \quad \text{Ec. 4.5.5}$$

$$E_{HB}(\rho^{BCP}) = 191.4\rho^{BCP} - 1.78 \quad \text{Ec. 4.5.6}$$

El análisis QTAIM se llevó a cabo para las DHAQ donde por medio del visualizador AIM2000 se muestran los gráficos moleculares de estas estructuras (Figura 4.5a). Los puntos de color amarillo representan los puntos críticos del anillo y los puntos rojos representan los puntos críticos del enlace O-H. En este caso para las DHAQ se observa la formación del puente de hidrógeno entre el grupo ceto de la quinona y el grupo OH fenólico.

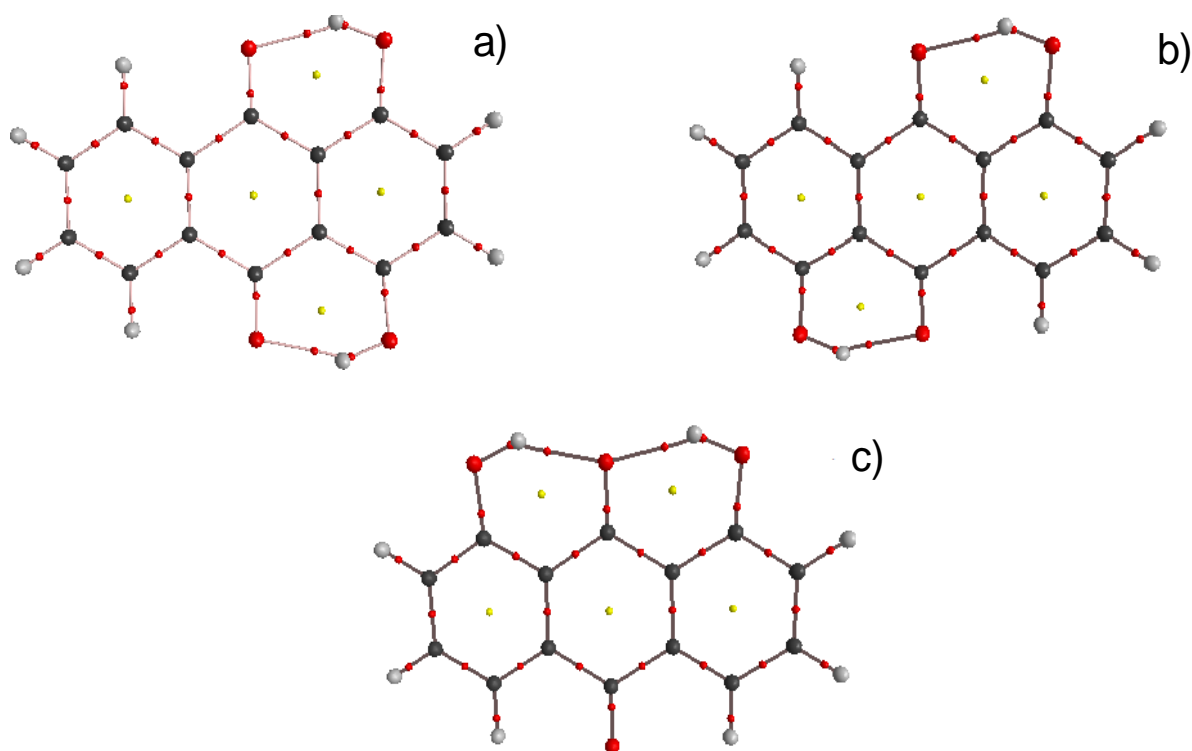


Figura 4.5a. Gráficas moleculares de a) H₂Qz, b) H₂Arf y c) H₂Cz

Los valores de $\rho(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ reportados en la Tabla 4.5a fueron usados para estimar los valores de E_{HB} para las DHAQ investigadas, usando las ecuaciones presentadas anteriormente, el valor de cada enfoque se muestra en la Tabla 4.5 b.

Tabla 4.5b. E_{HB} en kcal/mol calculadas con diferentes enfoques.

DHAQ	$E_{HB}(kcal/mol)$			
	Mata	Espinosa	Afonin (V)	Afonin (ρ)
H ₂ Qz	-6.21	-14.48	-8.47	-7.31
H ₂ Arf	-6.02	-14.03	-8.22	-7.11
H ₂ Cz	-5.96	-13.91	-8.16	-7.03

De acuerdo con la clasificación de la fuerza de enlace (Figura 4.5b) de Jeffrey [122] los enfoques de Mata, Espinosa y Afonin predicen interacciones de fuerza media. Vale la pena mencionar que a pesar de que todas las moléculas de estudio presentan doble interacción intramolecular, y son equivalentes por simetría, solamente se reporta el valor de E_{HB} de una interacción del enlace de hidrógeno por cada molécula.

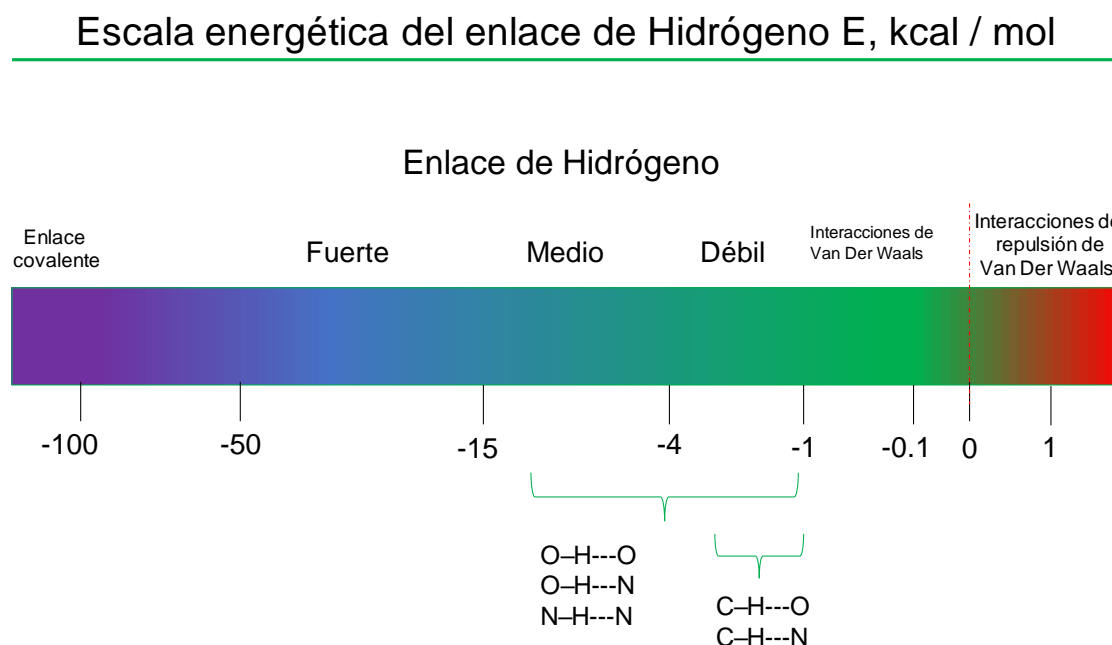


Figura 4.5b. Escala de energía del enlace de hidrógeno de acuerdo a Jeffrey [122].

De acuerdo con los valores obtenidos de E_{HB} con cada enfoque, la fuerza del enlace intramolecular es similar para todas las moléculas estudiadas. Considerando las pequeñas diferencias de E_{HB} una tendencia puede establecerse crisazina < antrarufina < quinizarina. Esta tendencia es la misma considerando el tipo de enfoque empleado.

La ausencia de la interacción del enlace de hidrógeno en antraflavina parece justificar el hecho de presentar los dos valores de pK_a más bajos de las moléculas investigadas. Se encontró que crisazina presenta las interacciones del enlace intramolecular más débiles, este hecho parece justificar en que presenta los valores de pK_a más bajos de las moléculas estudiadas, en cuanto a quinizarina y antrarufina los valores de E_{HB} no parecen ser suficientes para justificar el orden de acidez, esto parece ser consecuencia de que no solo las diferencias de E_{HB} son pequeñas, sino que también las diferencias en los valores de pK_a experimentales determinados de estas moléculas lo son.

4.5.1 Conclusiones parciales

Mediante el análisis topológico con QTAIM se estimaron las E_{HB} con diferentes enfoques encontrando que la fortaleza de enlace es de fuerza media, a pesar de las pequeñas diferencias energéticas en cada enfoque se estableció la tendencia

de fortaleza de enlace que parece justificar los valores de pK_a de crisazina, sin embargo, las diferencias energéticas de cada enfoque no permiten distinguir un cambio apreciable que se relacione con el valor de pK_a en el caso de antrarfina y quinizarina.

4.6 Constante de formación del complejo de inclusión

La interacción de Quinizarina con 2Hp β CD fue estudiada a pH 7.00 dado que a este valor de pH quinizarina se encuentra en su forma neutra y presenta problemas de solubilidad. Se eligió a quinizarina como modelo para su estudio ya que su estructura ha sido relacionada con las antraciclina, que son compuestos con propiedades antibióticas y antitumorales [123-125], ha sido usada como marcador en el uso de combustibles [126, 127] y aplicado como aditivo en lubricantes [128, 129].

De acuerdo con el diagrama de zonas de predominio de quinizarina mostrado en la Figura 4.5a, la especie predominante a $pH \leq 10.83$ es la especie neutra (H_2Qz), la solubilidad de esta especie en medio acuoso va disminuyendo a medida que disminuye el valor de pH. Para incrementar la solubilidad de las especies se utilizan las CDs, en este caso se eligió una CD modificada 2Hp β CD, debido a que se ha mostrado ser segura y efectiva en aplicaciones en la industria cosmética y alimenticia [74, 105, 106]. En este sentido se eligió trabajar a pH de 7.00 ya que a este valor de pH se garantiza que efectivamente se encuentra la especie neutra en el sistema y además porque gran parte de las reacciones químicas se llevan a cabo en el cuerpo humano a pH fisiológico.

Para que quinizarina entre en la cavidad de la 2Hp β CD debe tener dimensiones adecuadas que permitan la máxima inclusión en la cavidad. En la Figura 1.3b se reportaron las dimensiones de quinizarina las cuales son; ancho del anillo sin sustituir 5.0 Å, largo 9.4 Å, ancho del anillo sustituido con grupos OH 6.3 Å. Con el fin de investigar el tamaño de quinizarina a partir de la optimización de geometría, se tomaron en cuenta los ángulos y longitudes de enlace para estimar las dimensiones de dicha molécula, las cuales están representadas en la Figura 4.6a. Si se comparan las medidas de quinizarina reportadas por Kandoth [130] y las obtenidas mediante la optimización de geometría se observan diferencias de 0.04 Å para el ancho sin sustituir, 0.09 Å para el largo y 0.64 Å para el ancho del

anillo sustituido, lo que indica que los valores obtenidos están en acuerdo con los reportados.

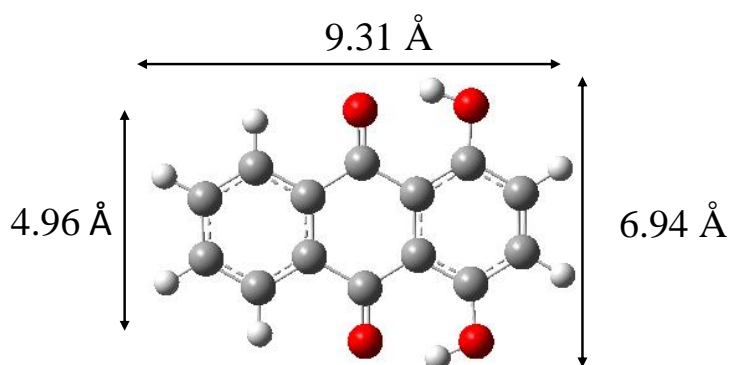


Figura 4.6a Dimensiones de Quinizarina calculadas a partir de la optimización de geometría con el funcional M06-2X y el conjunto de base 6-311 ++ G (d, p) y el modelo de solvente SMD

La Figura 4.6b muestra una familia de espectros UV-Vis de H_2Qz en solución acuosa a pH 7.02 como función de la longitud onda y $[2Hp\beta CD]$, del sistema $H_2Qz - 2Hp\beta CD$ la constante de inclusión fue estimada con SQUAD, con una estequiometría 1:1. Vale la pena mencionar que se intentó ajustar los datos proponiendo estequiometrías 2:1 (considerando 2 moléculas de H_2Qz y una de $2Hp\beta CD$) y 1:2 (una molécula de $2Hp\beta CD$ y dos de H_2Qz), sin embargo, los valores determinados por SQUAD no cumplían con los criterios estadísticos establecidos.

El comportamiento espectrofotométrico del sistema $H_2Qz-2Hp\beta CD$ en medio acuoso se muestra en un diagrama 3D (Figura 4.6a) donde se muestra la absorbancia – longitud de onda (λ) – ($-\log ([2Hp\beta CD])$) ($p2Hp\beta CD$) a pH 7.02.

El tratamiento de datos con SQUAD permitió estimar la constante de inclusión con estequiometría 1:1, la cual está en acuerdo con Kandoth y colaboradores [130], quienes mostraron que la formación del complejo ocurre cuando la molécula de quinizarina entra a la cavidad de la β -CD de tal forma que el anillo sin sustituir está orientado hacia el borde estrecho de quinizarina, proporcionándole la máxima inclusión en la cavidad y una mayor fuerza de formación intermolecular.

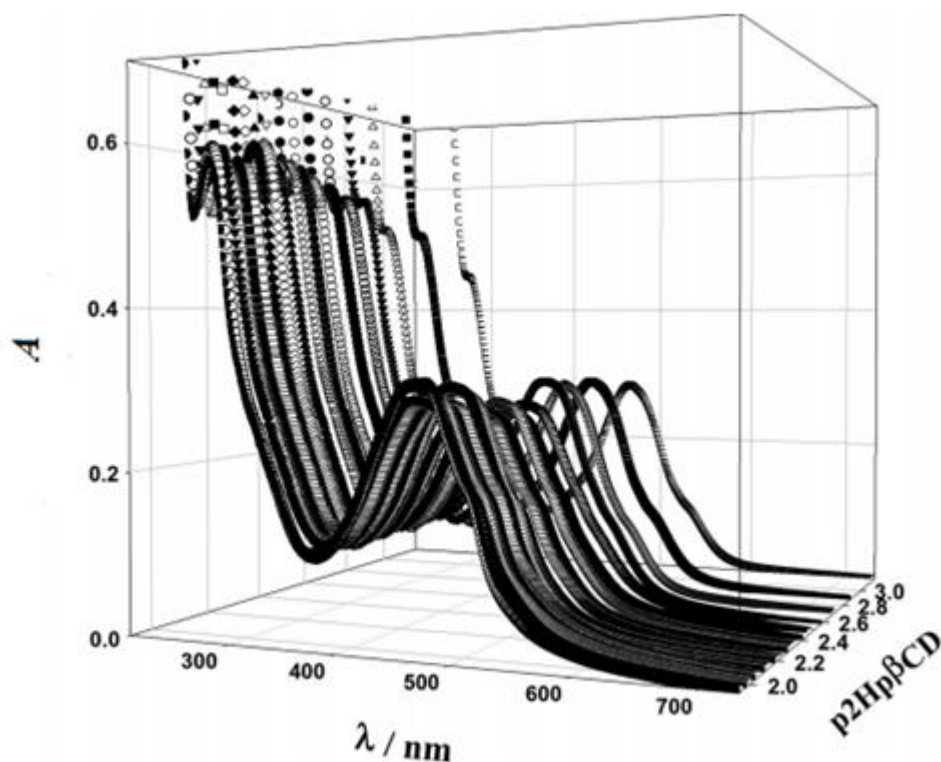


Figura 4.6b Familia de espectros UV-Vis en 3D: absorbancia – longitud de onda (λ) – $(-\log([2\text{Hp}\beta\text{CD}])(p2\text{Hp}\beta\text{CD}))$ obtenidos a H_2Qz 57 μM en solución acuosa a pH 7.02 a diferentes $[2\text{Hp}\beta\text{CD}]$ en un intervalo de concentraciones de (0.66 – 11.72) mM

Los datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda con diferentes $[2\text{Hp}\beta\text{CD}]$ fueron alimentados como datos de entrada al programa SQUAD en donde se obtuvieron como datos de salida la constante de formación global de H_2Qz y parámetros estadísticos, como la desviación estándar (σ_T), y mínimos cuadrados no lineales (U) reportados en la Tabla 4.6a.

Tabla 4.6a. Constante de inclusión de H_2Qz , calculada por medio de los espectros reportados en la Figura 4.6a y SQUAD.

Equilibrio Global de formación del complejo	$\log \beta$	U	σ_T
$\text{H}_2\text{Qz} + 2\text{Hp}\beta\text{CD} = \text{H}_2\text{Qz}\cdot 2\text{Hp}\beta\text{CD}$	2.53 ± 0.04	1.16×10^{-3}	7.42×10^{-3}

El gráfico de la Figura 4.6b, muestra la distribución de especies donde se puede apreciar la intersección de las bandas, en este punto las fracciones molares de ambas especies son equivalentes.

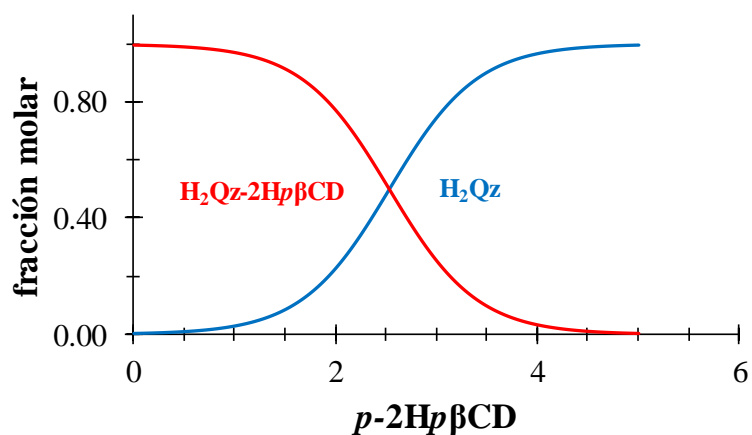


Figura 4.6b Diagrama de distribución de especies de H_2Qz y su complejo $2Hp\beta CD$

Realizando una comparación de los espectros que se obtuvieron de forma experimental con los espectros de absorción teóricos (Figura 4.6c), construidos a partir de datos estimados por SQUAD como los coeficientes de absorción molar (Tabla 4.6b) y el valor de β , se observa que a diferentes valores de pH ambos espectros de absorción se ajustan uno con el otro, que se interpreta como un buen ajuste entre el modelo químico con la estequiometría propuesta y los datos experimentales.

Tabla 4.6b. Coeficientes de absorptividad molar representativos para las especies H_2Qz y $H_2Qz-2Hp\beta CD$ como función de la longitud de onda, λ (reportados de 30 en 30 nm), calculado a través de SQUAD y sus espectros mostrados en Figura 4.6a.

λ / nm	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	
	$H_2Qz-2Hp\beta CD$	H_2Qz
360	2832	1386
390	2373	1635
420	3553	2500
450	5077	4261
480	5244	4565
510	3791	2325
540	1629	1505
570	925	278
600	556	11
630	330	0
660	195	0

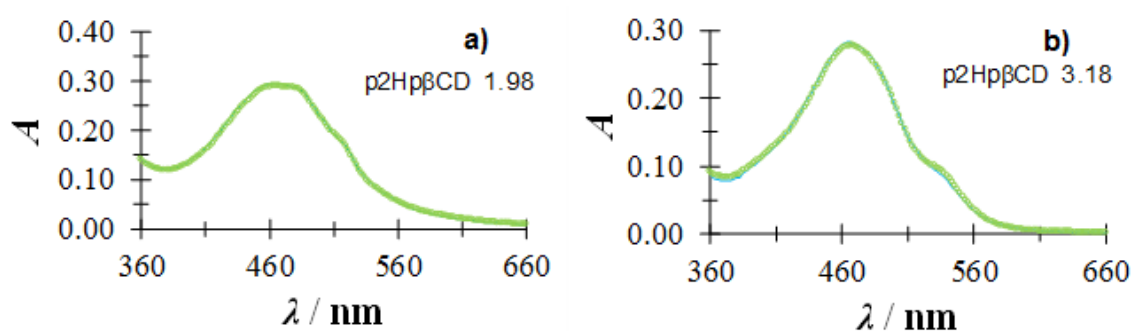


Figura 4.6c. Comparación de los espectros de absorción experimentales (marcadores) realizados a dos diferentes valores de $p2Hp\beta CD$: a) 1.98 y b) 3.18, con los espectros de absorción teóricos (líneas sólidas) generadas a partir de datos reportados en Tabla 4.6a y Tabla 4.6b.

4.6.1 Conclusiones parciales

Las dimensiones calculadas por medio de las longitudes de enlace de la estructura de quinizarina optimizada, coinciden con las reportadas en la literatura. La interacción de 2Hp β CD con H₂Qz fue monitoreada mediante espectroscopía UV-Vis a pH 7.00, los resultados muestran una constante de inclusión de 2.53 con estequiometría 1:1 la cual está en buen acuerdo con la reportado en estudios anteriores con β -CD.

4.7 Estudio electroquímico de Quinizarina

Un estudio electroquímico de H₂Qz con 2Hp β CD se llevó a cabo con el fin de corroborar la formación del complejo de inclusión. En la literatura se han encontrado pocos estudios de caracterización electroquímica de H₂Qz donde el empleo de electrodos de trabajo ha mostrado que el proceso es de adsorción los cuales trabajan a altas velocidades de barrido.

El estudio electroquímico se llevó a cabo en solución acuosa utilizando Buffer de fosfatos 0.1 M a pH=7.02 variando la concentración de 2Hp β CD.

La Figura 4.7a muestra un Voltamperograma Cíclico (VC) donde el pico de corriente anódico, i_{pa} , de los VC's permanece prácticamente constante en el intervalo de 2.5 a 3.2 de p2Hp β CD, sin embargo, para p2Hp β CD < 2.5, i_{pa} incrementan de forma lineal lo cual se observa en un gráfico de corriente de pico anódico vs p2Hp β CD (Figura 4.7b), el comportamiento observado muestra la formación del complejo de inclusión en 2.5. De estos resultados y del diagrama presentado en la Figura 4.6c puede concluirse que cuando el complejo de inclusión H₂Qz-2Hp β CD predomina en el sistema, la velocidad de oxidación electroquímica de quinizarina puede incrementar tres veces (para p2Hp β CD = 2.1) respectivamente de su valor, cuando H₂Qz es la especie predominante. Por esta razón se decidió llevar a cabo la cuantificación electroquímica de quinizarina en solución acuosa, fijando la concentración de 2Hp β CD a p2Hp β CD =2.1 (Anexo G).

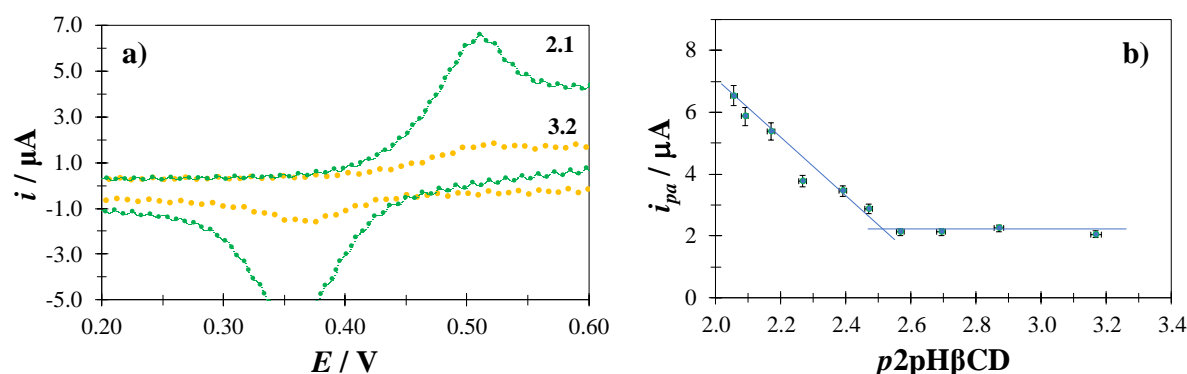


Figura 4.7. a) Voltamperograma Cíclico realizado en los sistemas CPE / H₂Qz 32.5 μM (pH 7.02, 0.1 M PBS) con diferentes valores de $p2\text{Hp}\beta\text{CD}$ ($-\log [2\text{Hp}\beta\text{CD}]$), indicados en la figura. En ambos casos el potencial de inicio fue de 0 V en dirección anódica a 0.8 V s^{-1} . **b)** Variación de la corriente del pico anódico, i_{pa} , de los VCs como función $p2\text{Hp}\beta\text{CD}$.

4.7.1 Conclusiones parciales

El comportamiento electroquímico de H₂Qz con 2Hp β CD reveló que la formación del complejo se da a partir de $p2\text{Hp}\beta\text{CD} > 2.5$, este valor concuerda con el obtenido por medio de espectroscopía UV-Vis.

4.8 Estudio de la capacidad antioxidante de las DHAQ

En esta sección se estudia la habilidad de las DHAQ para reducir RL por medio del ensayo con $\cdot\text{DPPH}$ y se evalúa la actividad antioxidante a través de la capacidad de las enzimas lacasa y tirosinada de reducir y oxidar a las DHAQ, esta actividad fue monitoreada por medio de biosensores enzimáticos amperométricos

4.8.1 Reacción del radical $\cdot\text{DPPH}$ con DHAQ

En presencia de compuestos antioxidantes el radical $\cdot\text{DPPH}$ puede aceptar un electrón confiriéndole al radical $\cdot\text{DPPH}$ estabilidad. Como la reducción del radical $\cdot\text{DPPH}$ se caracteriza por un amarillo pálido, es posible determinar la actividad antioxidante debido a un cambio de coloración el cual se monitorea espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la capacidad de un antioxidante

de capturar radicales libres, mayor es la reducción del radical \cdot DPPH y menos color púrpura habrá en la muestra. Mediante este principio se monitoreó la reacción del radical \cdot DPPH en el tiempo con la adición de cada DHAQ, consiguiendo una curva de calibración con diferentes volúmenes de Trolox manteniendo la concentración del radical \cdot DPPH constante (1 mM), figura 4.8.1a, obteniendo una dependencia lineal graficando la Absorbancia en función de la concentración de Trolox de la cual se conoce la pendiente, que posteriormente es comparada con la pendiente de cada muestra.

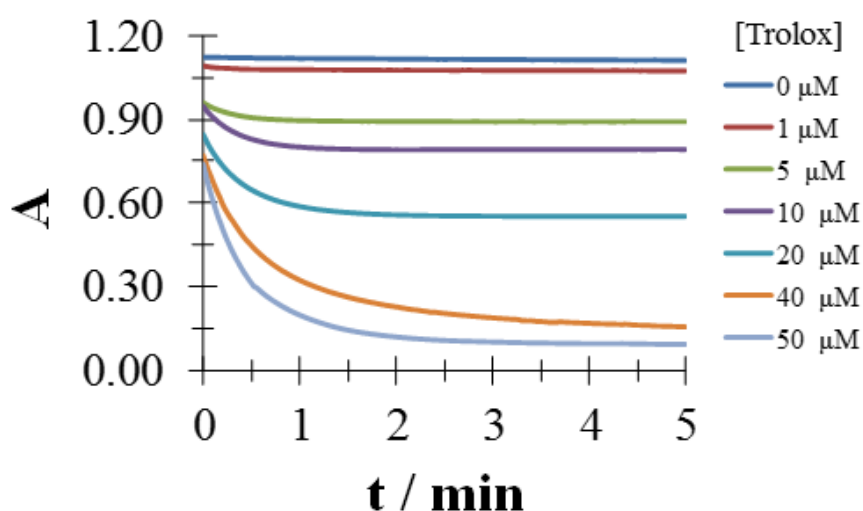


Figura 4.8.1a. Descenso de la absorbancia de Trolox, a diferentes Concentraciones (0-50 μ M), debido a la reacción con el radical \cdot DPPH (1 mM).

El descenso de la absorbancia en función del tiempo para las DHAQ (Figura 4.81b) se obtuvo de forma similar a la de Trolox, con diferentes volúmenes de la muestra en donde la concentración más representativa en la cual se observa la reducción del radical \cdot DPPH por el antioxidante fue de 0.1 mM.

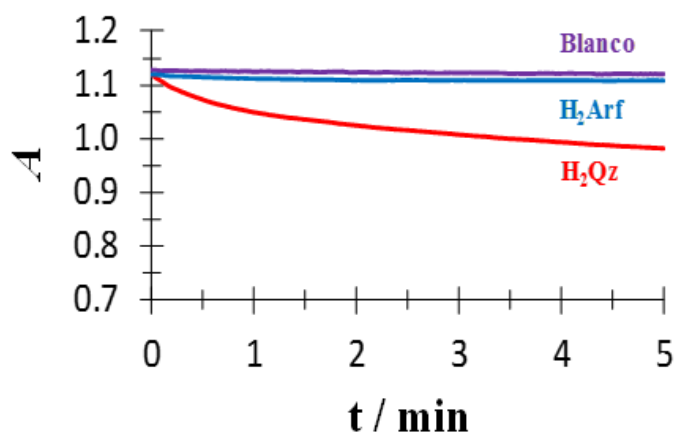
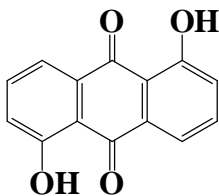
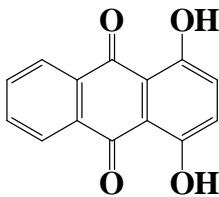


Figura 4.8.1b. Reacción del radical DPPH con Quinizarina (H₂Qz, curva roja)) y Antrarufina (H₂Arf, curva azul)

Los resultados de la reacción del radical [•]DPPH con H₂Arf y H₂Qz expresados en equivalentes a Trolox se muestran en la Tabla 4.8.1a donde se observa que H₂Arf y H₂Qz presentan un descenso en la absorbancia menor comparada con Trolox, no se observó reacción con el radical en el caso de H₂Cz y H₂Afv.

Tabla 4.8.1a. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de antraquinonas dihidroxiladas con el ensayo con [•]DPPH

DHAQ	(TEAC ± *σ) x10 ²
 <p>H₂Arf</p>	(3.78 ± 1.3)
 <p>H₂Qz</p>	(8.60 ± 3.90)

*σ fue estimada de la repetición de tres experimentos en las mismas condiciones.

Cabe señalar que las DHAQ al ser compuestos coloreados absorben en intervalos mayores de 300 nm esto implica que pueden interferir en la reacción de reducción del [•]DPPH ya que este radical muestra dos bandas de absorción una en 331 y 514 nm respectivamente.

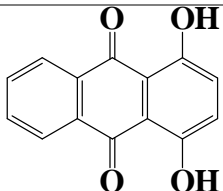
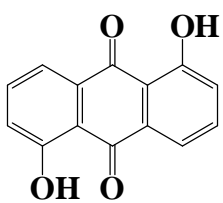
4.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante con Biosensores amperométricos enzimáticos

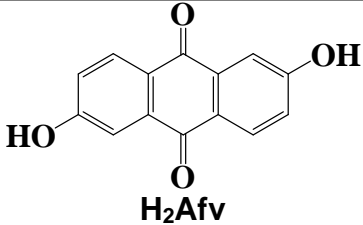
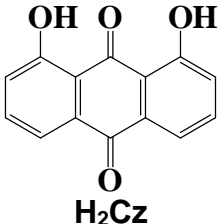
La actividad antioxidante de las DHAQ fue medida por medio de biosensores enzimáticos para observar si hay una mayor respuesta que con el ensayo con el radical \cdot DPPH. Un biosensor es un dispositivo que está formado por un elemento de reconocimiento, en este caso enzimas, que se encuentra en íntimo contacto con un sistema transductor el cual permite procesar la señal y relacionarla con la concentración del analito (Anexo D) [131].

En este método el biosensor se sumerge en una solución de fosfatos 0.1 M y se aplica un potencial en el cual la señal es estable, una vez estable, se agregan adiciones consecutivas de Trolox. A cada adición se le tomó lectura del cambio en la corriente y con esta información se construyen curvas de calibración (graficando la concentración del analito vs la corriente) para Trolox y las DHAQ. En la Tabla 4.8.2a se reporta la actividad enzimática en TEAC para biosensores con *Lacasa* y con biosensores de *Tirosinasa* los cuales se calcularon mediante la comparación de las pendientes resultantes de las curvas de calibración entre Trolox (m_T) y las pendientes de las muestras de las DHAQ (m_m).

$$TEAC = \frac{m_m}{m_T}$$

Tabla 4.8.2a. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) con biosensores de Tirosinasa y Lacasa

DHAQ	Biosensor de Tirosinasa TEAC $\pm \sigma$	Biosensor de Lacasa TEAC $\pm \sigma$
 <p>DHAQ</p>	$(9.10 \pm 0.40) \times 10^{-2}$	$(2.59 \pm 0.37) \times 10^{-2}$
 <p>H₂Qz</p> <p>H₂Arf</p>	$(2.01 \pm 0.14) \times 10^{-1}$	$(3.97 \pm 0.59) \times 10^{-2}$

 <p>H₂Afv</p>	$(1.21 \pm 0.07) \times 10^{-1}$	$(2.98 \pm 0.42) \times 10^{-2}$
 <p>H₂Cz</p>	$(1.01 \pm 0.03) \times 10^{-1}$	$(2.72 \pm 0.46) \times 10^{-2}$

σ^* La desviación estándar relativa fue estimada por la repetición de tres experimentos en las mismas condiciones. Se calculó como la raíz de la suma de los cuadrados de las desviaciones estándar relativas de las pendientes de trolox y de la muestra.

Los valores de TEAC de las DHAQ para el biosensor de Lacasa evidencian poca actividad antioxidante, sus valores son cercanos a cero, utilizando el biosensor de Tirosinasa se intensifica un poco la señal, sin embargo, las DHAQ no muestran ser mejores que Trolox. En el biosensor de Tirosinasa la mayor actividad corresponde a Antrarufina y las demás antraquinonas muestran una actividad más baja y muy similar.

La actividad enzimática sobre las DHAQ puede estar limitada debido a la presencia de la formación del puente de hidrógeno lo que dificulta que se lleve a cabo la oxidación de los grupos OH presentes en las DHAQ. La formación del enlace intramolecular juega un papel muy importante en la actividad antioxidante, así como la posición de los grupos OH, pues la sustitución de grupos OH en posición -orto (catecoles) da lugar a una mejor actividad esto se puede ver en la estructura de Alizarina, una antraquinona cuyos sitios sustituidos se encuentran en posición 1,2 (Figura 4.2a), mostrando un valor de TEAC de 1.05 ± 0.002 y en la molécula de purpurina, cuyos sitios sustituidos son 1,2,4, con un TEAC de 2.00 ± 0.0011 [132].

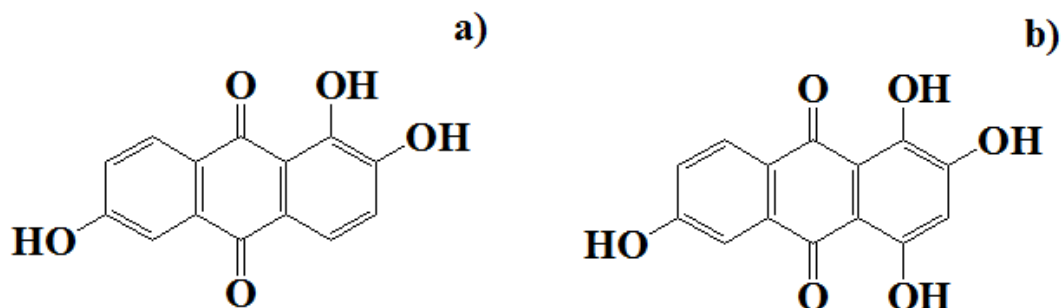


Figura 4.2a Estructuras químicas de dos antraquinonas con grupos OH sustituidos en posición *-orto* a) Alizarina y b) Purpurina.

Estudios basados en estructura electrónica proporcionan información acerca del mecanismo de neutralización de diferentes radicales, así como de la reactividad de los compuestos (Anexo H).

4.8.3 Conclusiones parciales

La capacidad antioxidante de las DHAQ se evaluó mediante el ensayo con DPPH y el uso de biosensores enzimáticos, los resultados expresados en equivalentes Trolox evidenciaron poca actividad antioxidante de las DHAQ, la presencia y el número de grupos OH sustituidos en posición *-orto* mejora la capacidad antioxidante de las antraquinonas.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

La estimación por PA permitió conocer los valores de pK_a , como primera revelación fisicoquímica, estos valores se utilizaron para determinar experimentalmente por primera vez las constantes de acidez en medio acuoso, por medio de espectroscopia UV-Vis, los valores obtenidos son: para quinizarina 10.83 ± 0.03 y 12.03 ± 0.03 , antrarufina 10.93 ± 0.03 , 12.49 ± 0.04 , crisazina 8.37 ± 0.01 y 12.37 ± 0.01 y antraflavina 7.47 ± 0.03 y 8.48 ± 0.03 , observándose que los valores más bajos de pK_a corresponden a Antraflavina, cuya molécula no presenta interacción de formación de puente de hidrógeno.

Del estudio de QTAIM para estimar la E_{HB} se estableció una tendencia en cuanto a fortaleza de enlace; crisazina < antrarufina < quinizarina. El hecho de que crisazina presente el valor más bajo de su primer pK_a parece estar relacionado con el hecho de que presenta interacción más débil con respecto a las moléculas estudiadas. En cuanto a antrarufina y quinizarina los valores de E_{HB} no parecen justificar el orden de acidez puesto que las diferencias de E_{HB} entre estas dos moléculas son pequeñas, sin embargo, las diferencia entre los valores de pK_a experimentales también lo son.

La baja solubilidad de la especie neutra de las DHAQ nos condujo a tomar como modelo a quinizarina y estudiar la interacción de su especie neutra con $2H\beta CD$ llevando a cabo un estudio con espectroscopia UV-Vis para monitorear la formación de complejo a pH 7.00 de H_2Qz con $2H\beta CD$ en medio acuoso obteniendo una constante de formación de 2.53 ± 0.04 con estequiometría 1:1 y se corroboró por medio del estudio electroquímico.

Puesto que las antraquinonas presentan propiedades bioactivas, se determinó la capacidad antioxidante mediante biosensores enzimáticos, dicho estudio reveló que su actividad es menor que Trolox. El ensayo con el radical $\cdot DPPH$ solo mostró reacción con quinizarina y antrarufina. En general, la actividad antioxidante de las DHAQ depende del sitio de sustitución de los grupos OH y se favorece en cuando la sustitución se encuentra en posiciones *-orto*.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados presentados en esta Tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan hacia las siguientes investigaciones:

- Realizar estudios espectrofotométricos y electroquímicos del resto de las DHAQ (antrarufina, crisazina y antraflavina) con 2Hp β CD, esto con el fin de mejorar la solubilidad de las DHAQ, en este sentido, también sería interesante llevar a cabo un estudio del efecto de la adición de surfactantes a las DHAQ.
- Ya que en el cuerpo humano se encuentran iones metálicos que son esenciales para el buen funcionamiento de enzimas y proteínas se propone el estudio de la interacción de metales de transición, por ejemplo, con Cu (II) y Ni (II), con DHAQ por medio de técnicas espectrofotométricas y electroquímicas.
- Otro estudio que sería interesante realizar, contemplando la relación entre DHAQ y Cu (II), es investigar la actividad antioxidante secundaria (por medio de una metodología basada en DFT), que consiste en la reducción de la producción de radicales hidroxilo (\cdot OH) por acción del complejo [DHAQ-Cu (II)].

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- [1] T.J. Monks, R.P. Hanzlik, G.M. Cohen, D. Ross, D.G. Graham, Quinone chemistry and toxicity, *Toxicology and applied pharmacology*, 112 (1992) 2-16.
- [2] M. Kohlmeier, A. Salomon, J. Saupe, M.J. Shearer, Transport of vitamin K to bone in humans, *The Journal of nutrition*, 126 (1996) 1192S-1196S.
- [3] C. Vermeer, K.-S. Jie, M. Knapen, Role of vitamin K in bone metabolism, *Annual review of nutrition*, 15 (1995) 1-21.
- [4] D. Siegel, E.M. Bolton, J.A. Burr, D.C. Liebler, D. Ross, The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD (P) H: quinone oxidoreductase: the role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant, *Molecular pharmacology*, 52 (1997) 300-305.
- [5] Y. Nagata, K.-H. Lan, X. Zhou, M. Tan, F.J. Esteva, A.A. Sahin, K.S. Klos, P. Li, B.P. Monia, N.T. Nguyen, PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients, *Cancer cell*, 6 (2004) 117-127.
- [6] N.B.R. Vittar, L. Comini, I.M. Fernandez, E. Agostini, S. Nuñez-Montoya, J.L. Cabrera, V.A. Rivarola, Photochemotherapy using natural anthraquinones: Rubiadin and Soranjidiol sensitize human cancer cell to die by apoptosis, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 11 (2014) 182-192.
- [7] C. Bishop, L. Tong, Equilibria of substituted semiquinones at high pH, *Journal of the American Chemical Society*, 87 (1965) 501-505.
- [8] Y.-S. Han, R. Van der Heijden, R. Verpoorte, Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae, *Plant cell, tissue and organ culture*, 67 (2001) 201-220.
- [9] H. Naeimi, R. Namdari, Rapid, efficient and one pot synthesis of anthraquinone derivatives catalyzed by Lewis acid/methanesulfonic acid under heterogeneous conditions, *Dyes and Pigments*, 81 (2009) 259-263.
- [10] P. Bányai, I. Kuzovkina, L. Kursinszki, É. Szőke, HPLC analysis of alizarin and purpurin produced by *Rubia tinctorum* L. hairy root cultures, *Chromatographia*, 63 (2006) S111-S114.
- [11] D. De Santis, M. Moresi, Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties, *Industrial Crops and Products*, 26 (2007) 151-162.

- [12] L. Dufossé, Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family, *Food research international*, 65 (2014) 132-136.
- [13] H. Strotmann, K. Brendel, K. Boos, E. Schlimme, Energy transfer inhibition in photosynthesis by anthraquinone dyes, *FEBS Letters*, 145 (1982) 11-15.
- [14] K.K. Schrader, F.E. Dayan, S.N. Allen, M.Q. de Regt, C.S. Tucker, J. Paul, Rex N, 9, 10-Anthraquinone reduces the photosynthetic efficiency of *Oscillatoria perornata* and modifies cellular inclusions, *International journal of plant sciences*, 161 (2000) 265-270.
- [15] J. Duval, V. Pecher, M. Poujol, E. Lesellier, Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: a review, *Industrial crops and products*, 94 (2016) 812-833.
- [16] G.R. Desiraju, T. Steiner, *The weak hydrogen bond: in structural chemistry and biology*, International Union of Crystal2001.
- [17] L. Cao, H. Yu, S. Shao, S. Wang, Y. Guo, Evaluating the antioxidant capacity of polyphenols with an off–on fluorescence probe and the mechanism study, *Analytical Methods*, 6 (2014) 7149-7153.
- [18] H. Yu, G. Li, B. Zhang, X. Zhang, Y. Xiao, J. Wang, Y. Song, A neutral pH probe of rhodamine derivatives inspired by effect of hydrogen bond on pKa and its organelle-targetable fluorescent imaging, *Dyes and Pigments*, 133 (2016) 93-99.
- [19] M.P. Pasechnik, A.G. Matveeva, K.A. Lyssenko, R.R. Aysin, A.F. Smol'yakov, Y.V. Zubavichus, I.A. Godovikov, E.I. Goryunov, Competing intramolecular vs. intermolecular hydrogen bonding in phosphoryl-containing secondary alkanols: A structural, spectroscopic and DFT study, *Journal of Molecular Structure*, (2018).
- [20] Z. Marković, S. Jeremić, J.D. Marković, M.S. Pirković, D. Amić, Influence of structural characteristics of substituents on the antioxidant activity of some anthraquinone derivatives, *Computational and Theoretical Chemistry*, 1077 (2016) 25-31.
- [21] G.C. Derksen, T.A. van Beek, Æ. de Groot, A. Capelle, High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycosides and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.), *Journal of Chromatography A*, 816 (1998) 277-281.

- [22] H.-S. Lee, Inhibitory Effects of Quinizarin Isolated from Cassia tora Seeds Against Human Intestinal Bacteria and Aflatoxin B₁ Biotransformation, *Journal of microbiology and biotechnology*, 13 (2003) 529-536.
- [23] N. Davis, S. Iyer, U. Diener, Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (1987) 1593-1595.
- [24] B.-Y. Kwak, D.-H. Shon, B.-J. Kwon, C.-H. Kweon, K.-H. Lee, Detection of *Aspergillus* and *Penicillium* genera by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody, *Journal of microbiology and biotechnology*, 11 (2001) 21-28.
- [25] Z.C. Xu, J.Y. An, Y.Z. Hu, F. Tian, Photoinduced one-electron reduction of 1, 4-dihydroxyanthraquinone, *Chinese Chemical Letters*, 11 (2000) 479-482.
- [26] M. Konishi, H. Ohkuma, T. Tsuno, T. Oki, G.D. VanDuyne, J. Clardy, Crystal and molecular structure of dynemicin A: a novel 1, 5-diyne-3-ene antitumor antibiotic, *Journal of the American Chemical Society*, 112 (1990) 3715-3716.
- [27] L. Quinti, N.S. Allen, M. Edge, B.P. Murphy, A. Perotti, A study of the strongly fluorescent species formed by the interaction of the dye 1, 4-dihydroxyanthraquinone (quinizarin) with Al (III), *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 155 (2003) 79-91.
- [28] K. Idriss, E.Y. Hashem, M. Abdel-Aziz, H. Ahmed, Direct spectrophotometric determination of aluminum oxide in portland cement and cement clinker, *Cement, concrete and aggregates*, 23 (2001) 57-65.
- [29] J. Werner, Amination by reduction, *Industrial & Engineering Chemistry*, 40 (1948) 1574-1583.
- [30] K. Gunaydin, G. Topcu, R.M. Ion, 1, 5-Dihydroxyanthraquinones and an anthrone from roots of *Rumex crispus*, *Natural product letters*, 16 (2002) 65-70.
- [31] T. Eom, E. Kim, J.-S. Kim, In vitro antioxidant, antiinflammation, and anticancer activities and anthraquinone content from *Rumex crispus* root extract and fractions, *Antioxidants*, 9 (2020) 726.
- [32] M. Uzun, L. Demirezer, Anti-aging power of *Rumex crispus* L.: Matrixmetalloproteinases inhibitor, sun protective and antioxidant, *South African Journal of Botany*, 124 (2019) 364-371.
- [33] P. Ladell, Isolation and characterization of antibiotics produced by the nematode symbiont *Xenorhabdus szentirmaii*, A Thesis Submitted in Partial

Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biology
2011.

- [34] S. Say-Liang-Fat, J.-P. Cornard, A. Moncombe, Study on chrysazin–aluminium (III) interaction in solution by spectroscopy and quantum chemical calculations, *Polyhedron*, 48 (2012) 237-244.
- [35] A.D. Ayrton, D.F. Lewis, C. Ioannides, R. Walker, Anthraflavic acid is a potent and specific inhibitor of cytochrome P-448 activity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 916 (1987) 328-331.
- [36] A.D. Ayrton, C. Ioannides, R. Walker, Anthraflavic acid inhibits the mutagenicity of the food mutagen IQ: mechanism of action, *Mutation Research Letters*, 207 (1988) 121-125.
- [37] G.C. Derksen, G.P. Lelyveld, T.A. van Beek, A. Capelle, Æ. de Groot, Two validated HPLC methods for the quantification of alizarin and other anthraquinones in *Rubia tinctorum* cultivars, *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 15 (2004) 397-406.
- [38] Y.-M. Kim, C.-H. Lee, H.-G. Kim, H.-S. Lee, Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (2004) 6096-6100.
- [39] R. Winter, K.A. Cornell, L.L. Johnson, L.M. Isabelle, D.J. Hinrichs, M.K. Riscoe, Hydroxy-anthraquinones as antimalarial agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5 (1995) 1927-1932.
- [40] A. Afkhami, F. Khajavi, H. Khanmohammadi, Spectrophotometric determination of acidity and tautomeric constants and hydrogen bonding strength for a new Schiff base using hard modeling and multivariate curve resolution alternative least squares methods, *Analytica chimica acta*, 634 (2009) 180-185.
- [41] Y. Ebead, H. Salman, M. Khodari, A. Ahmed, Spectrophotometric investigations of the role of the organic solvent on the acid dissociation constants of some azo dyes derived from 2-aminobenzothiazole, *Journal of Molecular Liquids*, 154 (2010) 52-57.
- [42] G. Völgyi, R. Ruiz, K. Box, J. Comer, E. Bosch, K. Takács-Novák, Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble

compounds: validation study in a new cosolvent system, *Analytica chimica acta*, 583 (2007) 418-428.

[43] A. Albert, *The determination of ionization constants: a laboratory manual*, Springer Science & Business Media 2012.

[44] A. Avdeef, pH-metric log P. II: Refinement of partition coefficients and ionization constants of multiprotic substances, *Journal of pharmaceutical sciences*, 82 (1993) 183-190.

[45] J. Cleveland Jr, M. Benko, S. Gluck, Y. Walbroehl, Automated pKa determination at low solute concentrations by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 652 (1993) 301-308.

[46] J. Barbosa, E. Bosch, R. Carrera, A comparative study of some hydroxyanthraquinones as acid-base indicators, *Talanta*, 32 (1985) 1077-1081.

[47] Z. Jia, T. Ramstad, M. Zhong, Medium-throughput pKa screening of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1112-1118.

[48] J. Bezençon, M.B. Wittwer, B. Cutting, M. Smieško, B. Wagner, M. Kansy, B. Ernst, pKa determination by ¹H NMR spectroscopy—An old methodology revisited, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 93 (2014) 147-155.

[49] R. Álvarez-Diduk, M.T. Ramírez-Silva, A. Galano, A. Merkoçi, Deprotonation mechanism and acidity constants in aqueous solution of flavonols: a combined experimental and theoretical study, *The Journal of Physical Chemistry B*, 117 (2013) 12347-12359.

[50] H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer, A.D. Zuberbu, Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—II 32, 95.: Specfit: two user-friendly programs in basic and standard fortran 77, *Talanta*, 32 (1985) 257-264.

[51] Y.E. Zevatskiy, D.O. Ruzanov, D.V. Samoylov, Photometric method for determination of acidity constants through integral spectra analysis, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 141 (2015) 161-168.

[52] J. Havel, M. Meloun, D. Leggett, *Computational methods for the determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, (1985).

[53] J.R. Pliego, J.M. Riveros, Theoretical Calculation of pK_a Using the Cluster-Continuum Model, *The Journal of Physical Chemistry A*, 106 (2002) 7434-7439.

- [54] T. Mukherjee, One-electron reduction of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone): a pulse radiolysis study, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 29 (1987) 455-462.
- [55] S. Rouhani, S. Salimi, Optical pH sensor based on quinizarin for alkaline pH regions, *Progress in Color, Colorants and Coatings*, 1 (2008) 11-17.
- [56] R. Kiraly, R.B. Martin, Metal ion binding to daunorubicin and quinizarin, *Inorganica Chimica Acta*, 67 (1982) 13-18.
- [57] J. Barbosa, J. Sanchez, E. Bosch, Study of 1, 4-dihydroxyanthraquinone as an acid-base indicator in isopropyl alcohol medium: Evaluation of colour-change limits through complementary chromaticity parameters, *Talanta*, 31 (1984) 279-282.
- [58] L.-J. Yang, B. Yang, W. Chen, R. Huang, S.-J. Yan, J. Lin, Host-guest system of nimbin and β -cyclodextrin or its derivatives: preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (2010) 8545-8552.
- [59] Y. Wei, J. Zhang, A.H. Memon, H. Liang, Molecular model and in vitro antioxidant activity of a water-soluble and stable phloretin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, *Journal of Molecular Liquids*, 236 (2017) 68-75.
- [60] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nature reviews Drug discovery*, 3 (2004) 1023.
- [61] X. Ge, Z. Huang, S. Tian, Y. Huang, C. Zeng, Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity, *Carbohydrate polymers*, 89 (2012) 208-212.
- [62] Y. Wei, J. Zhang, Y. Zhou, W. Bei, Y. Li, Q. Yuan, H. Liang, Characterization of glabridin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity, *Carbohydrate polymers*, 159 (2017) 152-160.
- [63] G. Liu, Q. Yuan, G. Hollett, W. Zhao, Y. Kang, J. Wu, Cyclodextrin-based host-guest supramolecular hydrogel and its application in biomedical fields, *Polymer Chemistry*, 9 (2018) 3436-3449.
- [64] L.-J. Yang, W. Chen, S.-X. Ma, Y.-T. Gao, R. Huang, S.-J. Yan, J. Lin, Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization, *Carbohydrate polymers*, 85 (2011) 629-637.

- [65] Z. Aytac, S.I. Kusku, E. Durgun, T. Uyar, Quercetin/ β -cyclodextrin inclusion complex embedded nanofibres: Slow release and high solubility, *Food chemistry*, 197 (2016) 864-871.
- [66] Z.-G. Luo, Y. Zhao, C. Ma, X.-M. Xu, X.-M. Zhang, N.-Y. Huang, H.-Q. He, Synthesis and anti-integrase evaluation of novel calix [4] arene derivatives containing the triazolyl 1, 3-diketo moiety, *Chinese Chemical Letters*, 25 (2014) 737-740.
- [67] V.D. Nair, R. Panneerselvam, R. Gopi, Studies on methanolic extract of *Rauvolfia* species from Southern Western Ghats of India—In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals, *Industrial Crops and Products*, 39 (2012) 17-25.
- [68] G. Davidov-Pardo, D.J. McClements, Resveratrol encapsulation: designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues, *Trends in Food Science & Technology*, 38 (2014) 88-103.
- [69] M. Singh, H. Pal, A. Koti, A. Sapre, Photophysical properties and rotational relaxation dynamics of neutral red bound to β -cyclodextrin, *The Journal of Physical Chemistry A*, 108 (2004) 1465-1474.
- [70] H.-J. Buschmann, E. Schollmeyer, Cucurbituril and β -cyclodextrin as hosts for the complexation of organic dyes, *Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry*, 29 (1997) 167-174.
- [71] M. Shaikh, J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, H. Pal, Tuning dual emission behavior of p-dialkylaminobenzonitriles by supramolecular interactions with cyclodextrin hosts, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7 (2008) 979-985.
- [72] S. Gould, R.C. Scott, 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): a toxicology review, *Food and Chemical Toxicology*, 43 (2005) 1451-1459.
- [73] C.-M. Phan, L.N. Subbaraman, L. Jones, In vitro drug release of natamycin from β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-functionalized contact lens materials, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25 (2014) 1907-1919.
- [74] L.E. Pinero, I. Lebrón, J. Correa, J. Díaz, L. Viera, R. Arce, C. García, R. Oyola, The effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the excited triplet state of promazine and chlorpromazine, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 228 (2012) 44-50.

- [75] P. Kaur, M. Chandel, S. Kumar, N. Kumar, B. Singh, S. Kaur, Modulatory role of alizarin from *Rubia cordifolia* L. against genotoxicity of mutagens, *Food and chemical toxicology*, 48 (2010) 320-325.
- [76] M. Kumar, M. Chandel, S. Kumar, S. Kaur, Amelioration of oxidative stress by anthraquinones in various in vitro assays, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2 (2012) S692-S698.
- [77] G.-C. Yen, P.-D. Duh, D.-Y. Chuang, Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone, *Food chemistry*, 70 (2000) 437-441.
- [78] M. Pickhardt, Z. Gazova, M. von Bergen, I. Khlistunova, Y. Wang, A. Hascher, E.-M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 3628-3635.
- [79] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life sciences*, 74 (2004) 2157-2184.
- [80] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 1173-1183.
- [81] C. Pinho, A. Couto, P. Valentão, P. Andrade, I. Ferreira, Assessing the anthocyanic composition of Port wines and musts and their free radical scavenging capacity, *Food chemistry*, 131 (2012) 885-892.
- [82] D. de Beer, E. Joubert, W.C. Gelderblom, M. Manley, Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: In vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation, *Food Chemistry*, 90 (2005) 569-577.
- [83] C. Sánchez-Moreno, Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, *Food Science and Technology International*, 8 (2002) 121-137.
- [84] M. Holasová, V. Fiedlerová, Application and Comparison of Methods of Antioxidant Activity Determination in Fruit and Vegetable Juices, *Chemické listy*, 105 (2011).
- [85] I. Gülçin, Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of toxicology*, 86 (2012) 345-391.

- [86] P. Sharma, R. Singh, Evaluation of antioxidant activity in foods with special reference to TEAC method, *American Journal of Food Technology*, 8 (2013) 83-101.
- [87] K. Takeshita, T. Ozawa, Recent progress in in vivo ESR spectroscopy, *Journal of radiation research*, 45 (2004) 373-384.
- [88] A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy, A computational methodology for accurate predictions of rate constants in solution: Application to the assessment of primary antioxidant activity, *Journal of computational chemistry*, 34 (2013) 2430-2445.
- [89] F. Arab, I. Alemzadeh, V. Maghsoudi, Determination of antioxidant component and activity of rice bran extract, *Scientia Iranica*, 18 (2011) 1402-1406.
- [90] J. Contreras-Calderón, L. Calderón-Jaimes, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova, Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia, *Food research international*, 44 (2011) 2047-2053.
- [91] C. Vassalle, S. Masini, C. Carpeggiani, A. L'abbate, C. Boni, G. Carlo Zucchelli, In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42 (2004) 84-89.
- [92] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion, The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity, *Bio-Assays for Oxidative Stress Status*, Elsevier 2001, pp. 120-130.
- [93] M.F. Barroso, J. Noronha, C. Delerue-Matos, M. Oliveira, Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (2011) 5062-5072.
- [94] M. Oroian, I. Escriche, Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Research International*, 74 (2015) 10-36.
- [95] A. Costa, M. Nunes, I. Almeida, M. Carvalho, M.F. Barroso, R.C. Alves, M. Oliveira, Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds, *LWT-Food Science and Technology*, 49 (2012) 324-328.
- [96] M.M. Kabanda, L. Mammino, L.C. Murulana, H.M. Mwangi, W.T. Mabusela, Antioxidant radical scavenging properties of phenolic pent-4-en-1-yne derivatives isolated from *Hypoxis rooperi*. A DFT study in vacuo and in solution, *International journal of food properties*, 18 (2015) 149-164.

- [97] N. Singh, R.J. Loader, P.J. O'Malle, P.L. Popelier, Computation of relative bond dissociation enthalpies (ΔBDE) of phenolic antioxidants from quantum topological molecular similarity (QTMS), *The Journal of Physical Chemistry A*, 110 (2006) 6498-6503.
- [98] G. Wang, Y. Xue, L. An, Y. Zheng, Y. Dou, L. Zhang, Y. Liu, Theoretical study on the structural and antioxidant properties of some recently synthesised 2, 4, 5-trimethoxy chalcones, *Food chemistry*, 171 (2015) 89-97.
- [99] M. Frisch, G. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. Petersson, Gaussian 09, revision D. 01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [100] Y. Zhao, N.E. Schultz, D.G. Truhlar, Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2 (2006) 364-382.
- [101] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *The Journal of Physical Chemistry B*, 113 (2009) 6378-6396.
- [102] Y. Wang, P. Verma, X. Jin, D.G. Truhlar, X. He, Revised M06 density functional for main-group and transition-metal chemistry, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (2018) 10257-10262.
- [103] K.F. BIEGLER, J. Schnbohm, D. Bayles, *A Program to Analyze and Visualize Atoms in Molecules*, (2001).
- [104] R.A. Marcus, *Transfer reactions in chemistry. Theory and experiment*, *Pure and applied chemistry*, 69 (1997) 13-30.
- [105] A.N. Diaz, Absorption and emission spectroscopy and photochemistry of 1, 10-anthraquinone derivatives: a review, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 53 (1990) 141-167.
- [106] Z. Yoshida, F. Takabayashi, Electronic spectra of mono-substituted anthraquinones and solvent effects, *Tetrahedron*, 24 (1968) 933-943.
- [107] A. Galano, A. Pérez-González, R. Castañeda-Arriaga, L. Muñoz-Rugeles, G. Mendoza-Sarmiento, A. Romero-Silva, A. Ibarra-Escutia, A.M. Rebollar-Zepeda, J.R. León-Carmona, M.A. Hernández-Olivares, Empirically Fitted Parameters for Calculating pK_a Values with Small Deviations from Experiments

Using a Simple Computational Strategy, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56 (2016) 1714-1724.

[108] I.D. Cunningham, K. Bhaila, D.C. Povey, Computational calculation of absolute aqueous pKa values for phenols, *Computational and Theoretical Chemistry*, 1019 (2013) 55-60.

[109] A. Klamt, G. Schüürmann, COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1993) 799-805.

[110] A. Rojas-Hernández, M. Ramírez, I. González, J. Ibanez, Predominance-Zone Diagrams in Solution Chemistry: Dismutation Processes in Two-Component Systems (ML), *Journal of chemical education*, 72 (1995) 1099.

[111] A. Rojas, I. González, Relationship of two-dimensional predominance-zone diagrams with conditional constants for complexation equilibria, *Analytica chimica acta*, 187 (1986) 279-285.

[112] R. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*: Oxford Univ. Press, Oxford, 1990.

[113] Y.P. Yurenko, R.O. Zhurakivsky, M. Ghomi, S.P. Samijlenko, D.M. Hovorun, Ab initio comprehensive conformational analysis of 2'-deoxyuridine, the biologically significant DNA minor nucleoside, and reconstruction of its low-temperature matrix infrared spectrum, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 1240-1250.

[114] F. Musso, S. Casassa, M. Corno, P. Ugliengo, How strong are H-bonds at the fully hydroxylated silica surfaces? Insights from the B3LYP electron density topological analysis, *Struct. Chem.*, (2017).

[115] N.Y. Acelas, S.M. Mejia, F. Mondragón, E. Flórez, Density functional theory characterization of phosphate and sulfate adsorption on Fe-(hydr)oxide: Reactivity, pH effect, estimation of Gibbs free energies, and topological analysis of hydrogen bonds, *Comput. Theor. Chem.*, 1005 (2013) 16-24.

[116] A. Ramírez-Solís, M. Hô, J. Hernández-Cobos, I. Ortega-Blake, Theoretical studies on the optimal X (OH) $\langle \text{inf}^3 \rangle$ -H $\langle \text{inf}^2 \rangle$ O (X = N, P, Sb) complexes: Interaction energies and topological analysis of the electronic density, *Chem. Phys. Lett.*, 524 (2012) 20-24.

[117] T.-H. Tang, E. Dereyey, S.K. Jensen, I. Csizmadia, Hydrogen bonds: relation between lengths and electron densities at bond critical points, *The*

European Physical Journal D-Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics, 37 (2006) 217-222.

[118] I. Mata, I. Alkorta, E. Molins, E. Espinosa, Universal Features of the Electron Density Distribution in Hydrogen-Bonding Regions: A Comprehensive Study Involving $H \cdots X$ ($X = H, C, N, O, F, S, Cl, \pi$) Interactions, Chemistry—A European Journal, 16 (2010) 2442-2452.

[119] C.J. Smallwood, M.A. McAllister, Characterization of low-barrier hydrogen bonds. 7. Relationship between strength and geometry of short-strong hydrogen bonds. The formic acid– formate anion model system. An ab initio and DFT investigation, Journal of the American Chemical Society, 119 (1997) 11277-11281.

[120] E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte, Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities, Chemical Physics Letters, 285 (1998) 170-173.

[121] A.V. Afonin, A.V. Vashchenko, M.V. Sigalov, Estimating the energy of intramolecular hydrogen bonds from 1 H NMR and QTAIM calculations, Organic & biomolecular chemistry, 14 (2016) 11199-11211.

[122] G.A. Jeffrey, G.A. Jeffrey, An introduction to hydrogen bonding, Oxford university press New York 1997.

[123] B. Kalyanaraman, E. Perez-Reyes, R.P. Mason, Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 630 (1980) 119-130.

[124] W.A. Remers, chemistry of antitumor antibiotics, Wiley 1979.

[125] F. Arcamone, Topics in Antibiotic Chemistry, by PG Sammes, Ellis Horwood, Chichester, England, 2 (1978) 98-239.

[126] M.A.G. Trindade, N.R. Stradiotto, M.V.B. Zanoni, Dyes markers of fuels: legislation and analytical methods for detection, Química Nova, 34 (2011) 1683-1691.

[127] A.V. Nowak, Analyzing marker dyes in liquid hydrocarbon fuels, Google Patents, 1990.

[128] M.W. Rembold, H.E. Kramer, The Role of Anthraquinonoid Dyes in the Catalytic Fading of Dye Mixtures—Substituent—dependent Triplet Yield of

Diaminoanthraquinones, *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 96 (1980) 122-126.

[129] M.W. Rembold, H.E. Kramer, Singlet oxygen as an intermediate in the catalytic fading of dye mixtures, *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 94 (1978) 12-17.

[130] N. Kandoth, S.D. Choudhury, T. Mukherjee, H. Pal, Host–guest interaction of 1, 4-dihydroxy-9, 10-anthraquinone (quinizarin) with cyclodextrins, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8 (2009) 82-90.

[131] D. Thevenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure Appl. Chem*, 71 (1999) 2333-2348.

[132] Y.-Z. Cai, M. Sun, J. Xing, Q. Luo, H. Corke, Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants, *Life sciences*, 78 (2006) 2872-2888.

[133] M.N. Velasco-Garcia, T. Mottram, Biosensor technology addressing agricultural problems, *Biosystems engineering*, 84 (2003) 1-12.

[134] P.D. Patel, Overview of affinity biosensors in food analysis, *Journal of AOAC International*, 89 (2006) 805-818.

[135] L.D. Mello, A.A. Alves, D.V. Macedo, L.T. Kubota, Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea, *Food chemistry*, 92 (2005) 515-519.

[136] R. Rawal, S. Chawla, C. Pundir, Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode, *Analytical biochemistry*, 419 (2011) 196-204.

[137] F.-D. Munteanu, A. Lindgren, J. Émneus, L. Gorton, T. Ruzgas, E. Csöregi, A. Ciucu, R. Van Huystee, I.G. Gazaryan, L.M. Lagrimini, Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases, *Analytical chemistry*, 70 (1998) 2596-2600.

[138] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 37663-37669.

[139] V. Madhavi, S. Lele, Laccase: properties and applications, *BioResources*, 4 (2009) 1694-1717.

- [140] A. Chaubey, B. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosensors and bioelectronics*, 17 (2002) 441-456.
- [141] N. Durán, M.A. Rosa, A. D'Annibale, L. Gianfreda, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme and microbial technology*, 31 (2002) 907-931.
- [142] K.U. Zaidi, A.S. Ali, S.A. Ali, I. Naaz, Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry, *Biochemistry research international*, 2014 (2014).
- [143] M. Amer, M. Metwalli, Topical liquiritin improves melasma, *International journal of dermatology*, 39 (2000) 299-301.
- [144] A. Sánchez-Ferrer, J.N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, F. García-Carmona, Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247 (1995) 1-11.
- [145] C.V. Ortiz Ruiz, Analysis and discrimination between substrates and inhibitors of tyrosinase= Análisis y discriminación entre sustratos e inhibidores de tirosinasa, *Proyecto de investigación*., (2016).
- [146] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*, 120 (2008) 215-241.
- [147] M.A.G. Trindade, U. Bilibio, M.V.B. Zanoni, Enhancement of voltammetric determination of quinizarine based on the adsorption at surfactant-adsorbed-layer in disposable electrodes, *Fuel*, 136 (2014) 201-207.
- [148] M.A.G. Trindade, V.S. Ferreira, M.V.B. Zanoni, A square-wave voltammetric method for analysing the colour marker quinizarine in petrol and diesel fuels, *Dyes and pigments*, 74 (2007) 566-571.
- [149] H. Eyring, The activated complex in chemical reactions, *The Journal of Chemical Physics*, 3 (1935) 107-115.
- [150] F.C. Collins, G.E. Kimball, Diffusion-controlled reaction rates, *Journal of colloid science*, 4 (1949) 425-437.

- [151] M. Von Smoluchowski, M. von Smoluchowski, Z. Phys. Chem. 92, 129 (1917), Z. Phys. Chem., 92 (1917) 129.
- [152] A. Einstein, A. Einstein, Ann. Phys.(Leipzig) 17, 549 (1905), Ann. Phys.(Leipzig), 17 (1905) 549.
- [153] M.E. Alberto, N. Russo, A. Grand, A. Galano, A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment, Physical Chemistry Chemical Physics, 15 (2013) 4642-4650.

ANEXOS



ANEXOS

Anexo A. Estabilidad de DHAQ

En la Figura A1 se muestran los espectros de absorción de las DHAQ después de 6 horas de su preparación (representados con líneas) comparados con los espectros de absorción al inicio de su preparación (puntos).

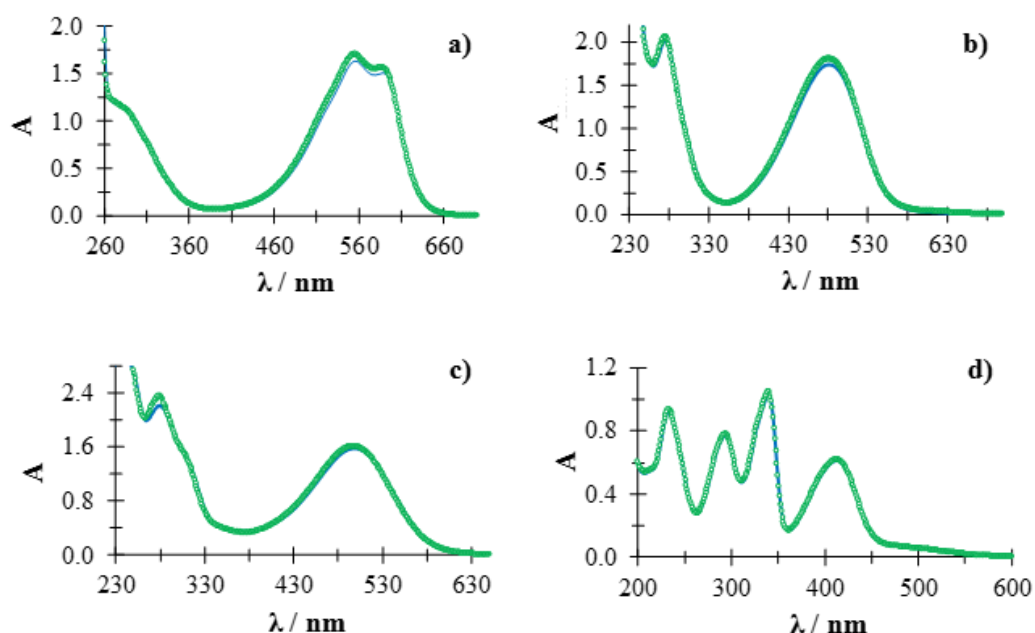


Figura A.1. Espectros de absorción de a) quinizarina b) antrarufina c) crisazina y d) antraflavina en medio acuoso

Anexo B. Descripción del programa computacional SQUAD

El programa SQUAD (Stability Quotients from Absorbance Data) es un programa diseñado para calcular los mejores valores de las constantes de estabilidad del modelo de equilibrio propuesto empleando un enfoque de mínimos cuadrados no lineales.

B.1 Algoritmos matemáticos

Para cada valor de la absorbancia

$$A_{i,j} = \sum_l^J [\text{species}]_{i,j} * \varepsilon_{j,k} \quad \text{Ec.B1.a}$$

Donde $[\text{species}]_{i,j}$ es la concentración de la j th especie en la i th solución (espectro), $\varepsilon_{j,k}$ es la absortividad molar de la j th especie y k th longitud de onda. SQUAD calcula los valores de las constantes de formación global, las cuales minimizan la suma de cuadrados residuales entre los valores de absorbancias observadas y calculadas

$$U = \sum_l^K \sum_l^I [A_{i,k}^{obs} - A_{i,k}^{cal}]^2 \quad \text{Ec.B1.b}$$

El refinamiento de las constantes de acidez se lleva a cabo por medio de métodos iterativos y una serie de subrutinas (Figura B.1) de las cuales se describen las más importantes.

Subrutina REFINE. Esta rutina controla el algoritmo principal de refinamiento la cual usa un enfoque clásico de Gauss-Newton. Se considera una convergencia completada si todos los cambios son menores al 0.1 % de cada constante.

Subrutina DIFF y SEARCH. DIFF emplea un algoritmo de diferencia central de Stirling. El Jacobiano y el Hessiano son desarrollados por SEARCH. La matriz de correlación se calcula en este tiempo.

Subrutina RESID. Acumula la suma de cuadrados residuales y controla la solución de la ley de Beer para las constantes de formación.

Subrutina CSCC Y COGSNR. Esas 2 rutinas son usadas para calcular las concentraciones de todas las especies en solución. La concentración total de cada componente de las constantes de formación son datos de entrada de esas rutinas.

La aparición del valor de las constantes de formación significa que todos los valores han sido encontrados durante el proceso de refinamiento incluyendo aquellos valores temporales generados durante el proceso de diferenciación numérica. La última rutina que resuelve las ecuaciones del balance de masa es llevada a cabo por medio del algoritmo de Newton-Raphson.

Subrutina SOLVE. Una vez que las concentraciones de todas las especies para el conjunto de las constantes han sido calculadas, la matriz de la absorbancia corregida pasa a la subrutina SOLVE.

Subrutina INOUT. Completa los datos de entrada y llama a la subrutina REFINE, una vez que se logra la convergencia controla los datos de salida de los resultados.

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

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

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

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

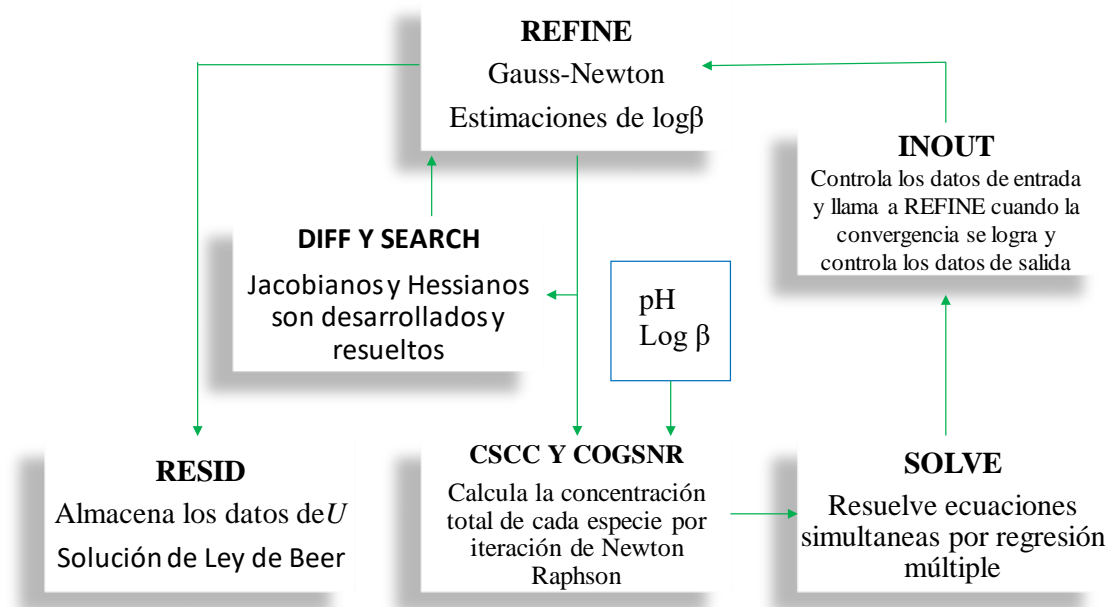


Figura B.1 Mapa conceptual de las subrutinas más importantes para la determinación de las constantes de formación (β) dadas por SQUAD.

Anexo C. Coeficientes de absorptividad molar (ϵ)

En las siguientes tablas se muestran los coeficientes de absorptividad característicos (30 en 30 nm) por especie.

Tabla C.1 Coeficientes de absorptividad molar (ϵ) para cada especie de Quinizarina a diferentes valores de longitud de onda (λ) calculados con SQUAD.

λ / nm	ϵ / M ⁻¹ cm ⁻¹		
	H ₂ Qz	HQz	Qz ²⁻
340	673	1747	483
370	519	448	229
400	511	235	286
430	546	548	267
460	558	1348	433
490	419	2771	1281
520	204	4283	3510
550	99	4704	6752
580	115	3839	6880
610	278	895	5832
640	328	25	933
660	316	0	174

Tabla C.2 Coeficientes de absorptividad molar (ϵ) para cada especie de Antrarufina a diferentes valores de longitud de onda (λ) calculados con SQUAD.

λ / nm	$\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$		
	H₂Arf	HArf	Arf²⁻
310	3273	3753	2936
340	2141	886	733
370	2510	962	716
400	2158	2586	2133
430	438	5749	4864
460	0	9307	7760
490	542	10321	8523
520	1874	6434	5471
550	2193	1651	1480
580	1109	249	377
610	385	86	201
310	3273	3753	2936

Tabla C.3 Coeficientes de absortividad molar (ε) para cada especie de Crisazina a diferentes valores de longitud de onda (λ) calculados con SQUAD.

λ / nm	$\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$		
	H₂Cz	HCz	Cz²⁻
330	534	1155	1072
360	966	924	417
390	2175	943	354
420	3540	906	926
450	2840	1717	1772
480	443	2915	2946
510	0	3371	3487
540	0	2475	2454
570	0	1093	917
600	6	262	173
630	0	38	19

Tabla C.4 Coeficientes de absorptividad molar (ϵ) para cada especie de Antraflavina a diferentes valores de longitud de onda (λ) calculados con SQUAD.

λ / nm	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$		
	H_2Afv	HAfv^-	Afv^{2-}
210	22916	14763	15179
240	7992	18684	23352
270	33860	17031	9870
300	18347	17211	19849
330	1095	22113	25723
360	6340	6264	4932
390	332	5090	12955
420	0	2999	16918
450	0	3528	4372
480	119	3592	1883
510	138	2499	1369
540	81	1143	739

Anexo D. Biosensor Enzimático Amperométrico

D.1 Descripción de un biosensor enzimático amperométrico

Otro de los métodos para medir capacidad antioxidante es por medio de biosensores enzimáticos. Un biosensor es un dispositivo analítico integrado que combina una parte biológicamente sensible con un transductor, de forma que la reacción de reconocimiento molecular que se lleva a cabo se traduce en señal eléctrica el cuál se encuentra en íntimo contacto con un sistema transductor (Figura D.1a) el cual permite procesar la señal y relacionarla con la concentración del analito [131]. Los dos constituyentes forman una unidad funcional cuya sensibilidad viene dada por la parte biológicamente activa y la sensibilidad se consigue mediante un mecanismo de transducción adecuado. Las partes que integran un biosensor son el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el contraelectrodo como se presenta en la Figura D.1b.

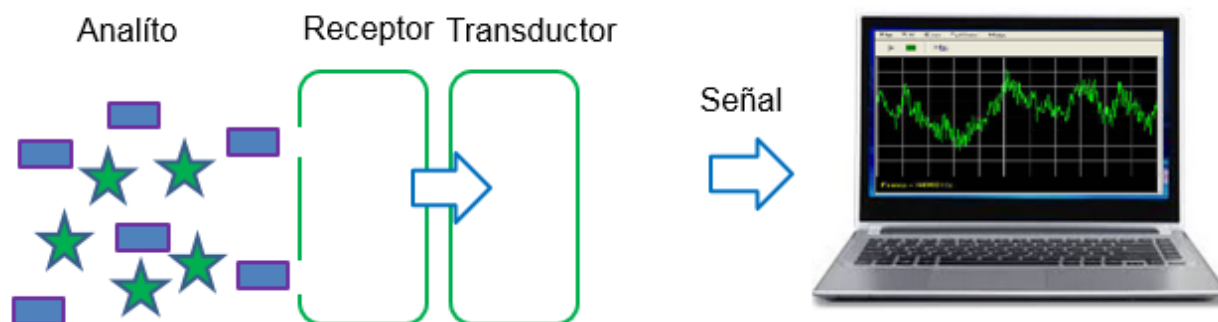


Figura D.1a. Proceso de transducción de la señal del analito

Los elementos más utilizados como elemento de reconocimiento son las enzimas óxido-reductasas pues las especies consumidas o reducidas durante el proceso de óxido-reducción, suelen ser fácilmente leídas por el transductor amperométrico [133-135]. Dentro de este grupo se encuentra la Lacasa que cataliza la oxidación de compuestos bifenólicos por medio de la reducción de oxígeno molecular a agua [136] y la Tirosinasa es selectiva a monofenoles y bifenoles en posición *-orto*, esta enzima tiene la desventaja de no mostrar actividad para compuestos que se encuentren sustituidos en posiciones *-para* y

-meta bencenodiol. La reducción de las quinonas generadas en la reacción enzimática es usada para monitorear la reacción.

Las enzimas son inmovilizadas

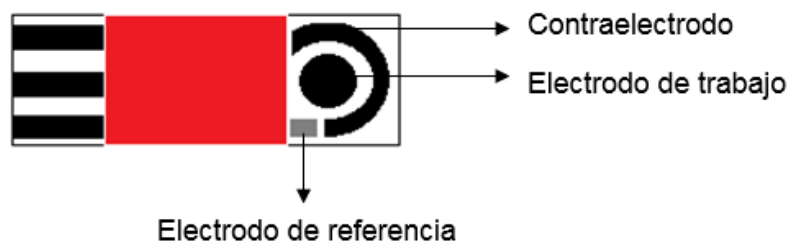


Figura D.1b. Elementos que integran un sensor

En este método se mide el flujo de corriente que se genera en la superficie del electrodo de trabajo cuando tiene lugar la oxidación o reducción de alguna de las especies implicadas en la reacción enzimática, y la señal dada se correlaciona con la concentración del sustrato.

D.2 Actividad enzimática de Lacasa

La enzima Lacasa aparece como un fuerte candidato en uso de biosensores, proporcionando algunas ventajas específicas sobre otra enzima, tal como la habilidad de catalizar reacciones de transferencia electrónica sin cofactores adicionales. Esta enzima oxida fenoles y compuestos o, m, p-bencenodiol en presencia de oxígeno molecular y presenta buena estabilidad [137].

En general la Lacasa tiene una masa molar entre 60-80 KDa y un punto isoeléctrico entre 4-7, dependiendo de la glicosilación, la Lacasa está formada por 4 átomos de cobre (cobre tipo 1, cobre tipo 2, y dos átomos de cobre tipo 3) los cuales forman el sitio activo de la enzima [138]. Estos átomos de cobre están clasificados dentro de 3 grupos dependiendo de las características obtenidas por

espectroscopía de Resonancia Paramagnética UV/Vis y Resonancia Paramagnética Electrónica (por sus siglas en inglés, EPR):

- 1.- El cobre 1 (T1, ligado por al menos una Cisteína y una Histidina). Es responsable del color azul intenso de la enzima, tiene una fuerte absorción electrónica a aproximadamente 600 nm y es detectable por EPR.
2. El cobre tipo 2 (T2 ligado por dos Histidinas) no muestra absorción en el espectro visible (incolore) pero revela propiedades EPR detectables y
3. El cobre tipo 3 consiste en un par de átomos de cobre acoplados anti-ferromagnéticamente (T3, cada uno ligado por tres Histidinas) caracterizados espectroscópicamente por una débil adsorción a 330 nm (forma oxidada) y por la ausencia de una señal EPR [138-141].

El mecanismo catalítico de las Lacasas comienza con la donación de un electrón al sustrato por parte del sitio T1 de cobre (Figura D.2a), seguido por una transferencia interna electrónica desde la forma reducida T1 a los sitios de cobre T2 y T3. El cobre T3 funciona como un aceptor de dos electrones en el proceso de oxidación aeróbica, en el cual la presencia del cobre T2 es necesaria. La reducción de oxígeno a agua tiene lugar en el grupo T2 y T3 y pasa a través de un intermediario de peróxido.

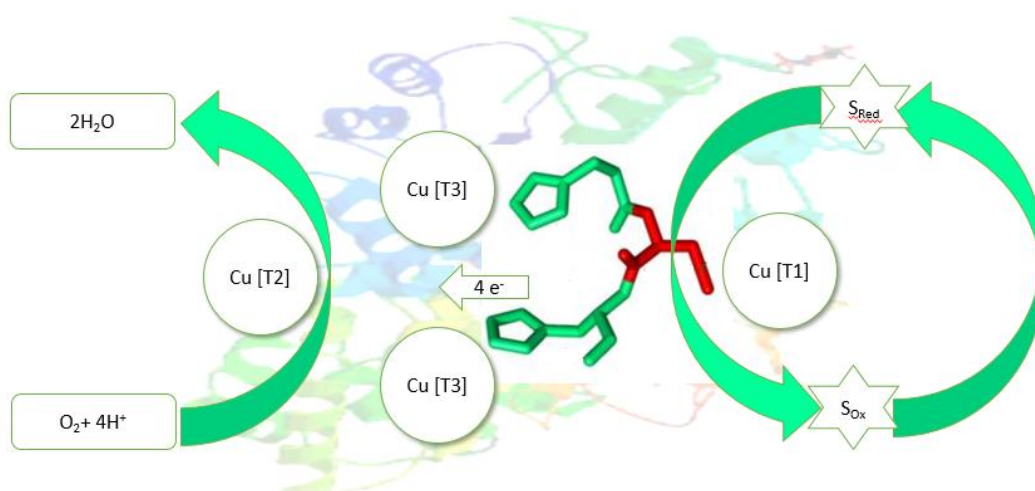


Figura D.2a Mecanismo catalítico simplificado de Lacasa con un sustrato [138]

D.3 Actividad enzimática de Tirosinasa

La tirosinasa está ampliamente distribuida en la naturaleza desde microorganismos a humanos para producir pigmentos de melanina. Su función para defender sus cuerpos de varias circunstancias, tales como daño a la piel por irradiación UV [5], sin embargo, una sobreproducción de pigmentos de melanina se convierte en problemas desde puntos de vista cosméticos y clínicos, tal como melasma y melanosis [142, 143].

La Tirosinasa cataliza la oxidación de monofenoles a orto-quinonas (actividad monofenolasa y la oxidación de orto-difenoles a ortoquinonas (actividad difenolasa) [144].

El sitio activo de la enzima se conforma de seis residuos de histidinas, los cuales están coordinando los dos iones cobre [144] (Figura D.3a).

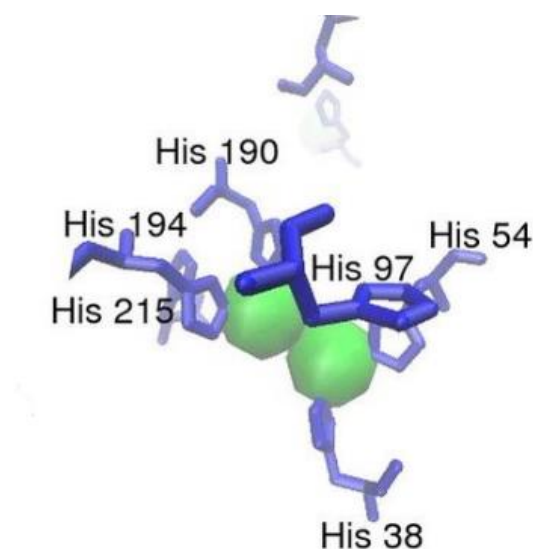


Figura D.3a Sitio activo de Tirosinasa conformada por 6 histidinas [145]

La Tirosinasa lleva a cabo la oxidación de fenoles y catecoles usando O_2 formando benzoquinonas, los hidrógenos que son extraídos del catecol se combinan con el oxígeno para formar agua.

Las o-quinonas producidas de los orto-fenoles pueden ser electroquímicamente reducidas a catecol sin mediador sobre la superficie electródica, la reacción se lleva a cabo midiendo la reducción electroquímica de las quinonas producidas enzimáticamente, y generadas en la reacción (producto de oxidación de fenoles). La orto-quinona producida es reducida por el electrodo, regenerando el fenol original. Finalmente, la enzima es oxidada por el oxígeno a su forma nativa con producción de agua como se presenta en la Figura D.3b.

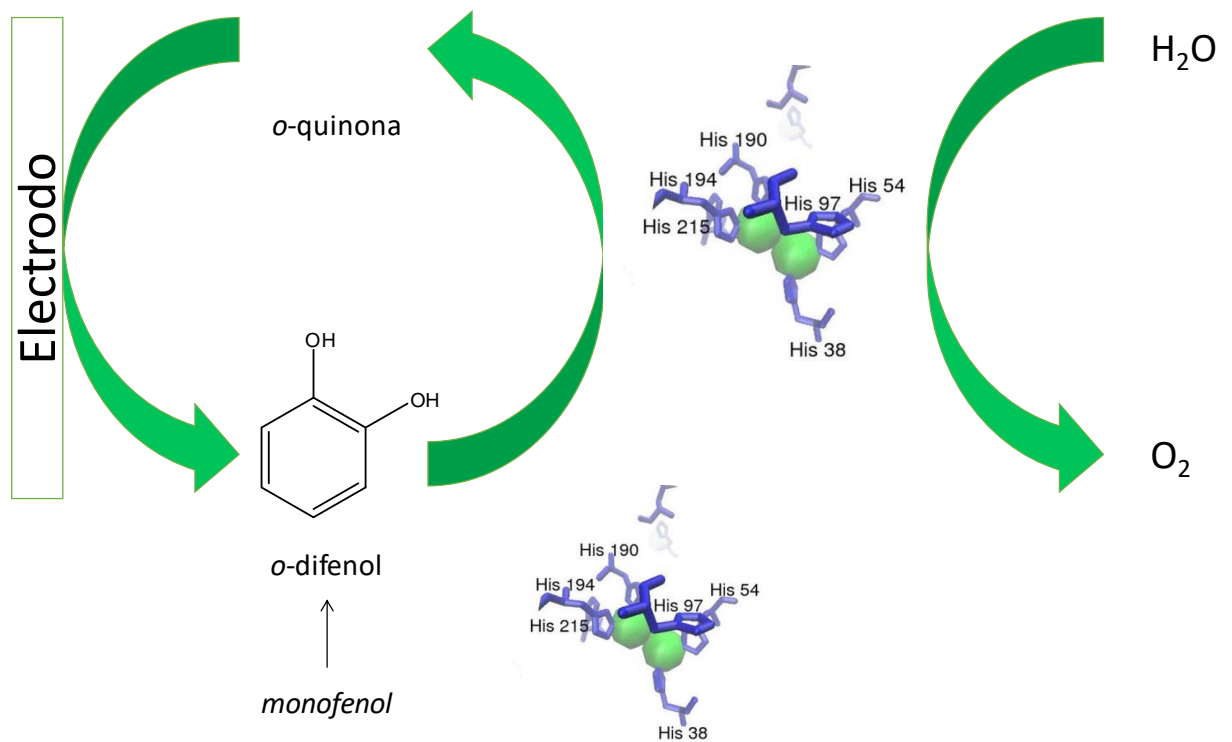


Figura D.3b. Proceso óxido- reducción de Tirosinasa para la producción de H_2O

Anexo E. Orden de desprotonación

Todos los cálculos fueron realizados con el paquete computacional Gaussian 09 [99]. Los cálculos de optimización y frecuencias de los puntos estacionarios se llevaron a cabo con el funcional M06-2X [146] con el conjunto de funciones de base 6-311+ G (d,p) y un modelo de solvatación basado en la densidad (SMD) [101] utilizando agua como solvente.

El orden de desprotonación para cada dihidroxi-antraquinona se estableció comparando las energías libres de Gibbs (kcal/mol) que se obtuvieron al sustraer los protones ionizables.

En la Tabla E.1 se reportan los valores de energías de Gibbs para cada sitio de desprotonación, observándose que ambos sitios de desprotonación tiene valores de energía similares por lo que es equivalente que la desprotonación proceda de un sitio u otro.

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

DHAQ	sitio de desprotonación	1 ^a desprotonación	2 ^a desprotonación
antrarufina	1	15.775	
	5	15.776	18.704
antraflavina	2	11.556	
	6	11.559	13.018
crisazina	1	15.039	21.982
	8	15.038	
quinizarina	1	15.811	20.041
	4	15.811	

El orden de desprotonación para cada dihidroxi-antraquinona se estableció comparando las energías libres de Gibbs (kcal/mol) que se obtuvieron al sustraer los protones ionizables.

Anexo F. Optimización de geometría

Se optimizó la geometría de las DHAQ para obtener la estructura más estable, se llevó a cabo con el funcional M06-2X y el conjunto de base 6-311 ++ G (d, p), utilizando el modelo de solvatación SMD a 298 K en medio acuoso. En la Figura F1 se muestran las moléculas de DHAQ, observándose que los anillo de estas estructuras son coplanares, gracias al anillo central de la quinona, además se observa la presencia del enlace de hidrógeno intramolecular cuyas distancias se reportan en Å.

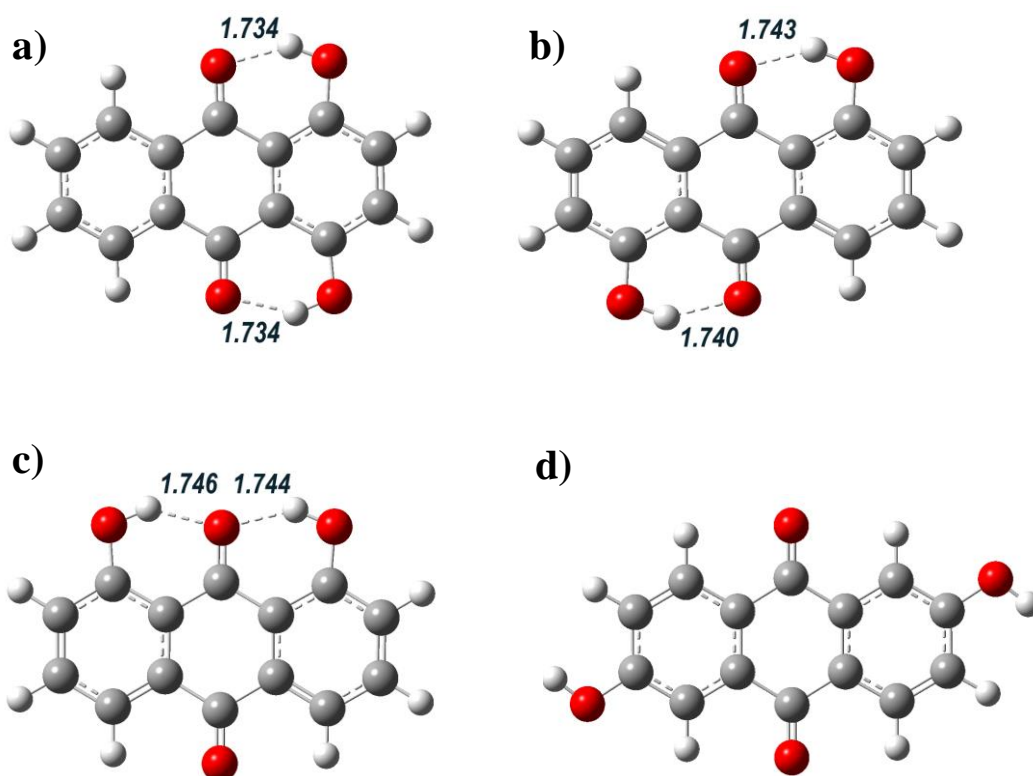


Figura F1. Geometrías optimizadas de las moléculas neutras de: a) quinizarina, b) antrarufina, c) crisazina y d) antraflavina. Las distancias están reportadas en Å.

Anexo G. Cuantificación de Quinizarina en presencia de otras dihidroxi-antraquinonas estudiadas

En Química Analítica uno de los objetivos principales es reportar la detección y la determinación de pequeñas concentraciones del analito que son calculados con certeza cuando se usa un procedimiento. En esta sección se muestra la cuantificación de H₂Qz por medio de UV-VIS y Voltamperometría Cíclica en presencia de antrarufina, crisazina y antraflavina.

El límite de detección (por sus siglas en inglés, detection limit, LOD) es la cantidad más pequeña del analito del que se puede decir, con un determinado nivel de confianza que está presente en la muestra.

El límite de cuantificación (por sus siglas en inglés, quantification limit, LOQ) es la cantidad más pequeña del analito que se puede cuantificar con un nivel de confianza dado.

Los LOD y LOQ dependen de la desviación estándar del blanco S_x , el valor de LOD se calcula como tres veces la desviación del blanco y el LOQ multiplicando el blanco por un factor de 10.

$$LOD = 3S_x \quad \text{Ec. G.1a}$$

$$LOQ = 10S_x \quad \text{Ec.G.1.b}$$

La desviación estándar del blanco S_x se obtiene de la desviación estándar residual al aplicar a los datos una regresión de mínimos cuadrados y se calcula como:

$$S_x = \left(\frac{S_y}{m} \right) \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. G.1.c}$$

En general la expresión anterior permite calcular la desviación estándar para la concentración obtenida a partir de la media y_x de un conjunto de n análisis repetidos cuando se obtiene una curva de calibración de n puntos. Recuérdese que \bar{y} es el promedio de la señal obtenida para los n datos de la calibración.

Los espectros de absorción UV-Vis de las DHAQ se muestran en la Figura 4.71. En el inciso a) se observa la absorción de Crisazina, en el inciso b) se muestra la absorción de Crisazina con la adición Antraflavina y en c) se muestra el espectro de absorción de b) más la adición de Antrarufina.

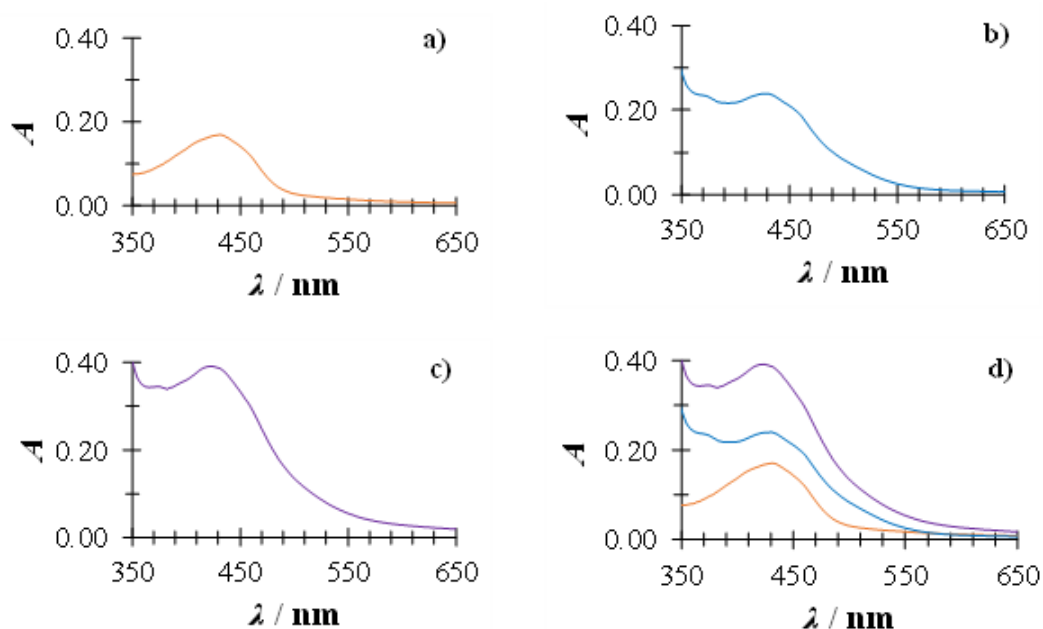


Figura G.1a Familia de espectros UV-Vis de dihidroxi-antraquinonas como interferentes: a) H₂Cz b) H₂Cz y H₂Afv, c) H₂Cz, H₂Afv y H₂Arf y d) todas los DHAQ

Como se observa en G.1a las DHAQ absorben en regiones similares del espectro electromagnético, los máximos de absorción se encuentran próximos entre sí por lo que se dificulta la cuantificación de H₂Qz de forma simultánea o en presencia de otras antraquinonas. Sin embargo, se obtuvieron los LOQ y LOD para H₂Qz sin interferentes los cuales se muestran en la Tabla G.1a.

Tabla G.1a. Parámetros analíticos de H₂Qz: sensibilidad, LOD, LOQ e intervalo lineal.

Técnica Experimental	Sensibilidad / $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}$	LOD / μM	LOQ / μM	Intervalo lineal / μM
UV-Vis	0.00547 ± 0.0001	1.411 ± 0.586	4.706 ± 0.551	0-29

Por otra parte, el estudio electroquímico se llevó a cabo adicionando DHAQ en presencia de 2H β CD (7.85 mM), La Figura G.1b muestra los VCs de a) H₂Cz, b) H₂Arf, c) H₂Afv y d) H₂Qz en presencia de todas las antraquinonas, todas a la misma concentración 27 μ M.

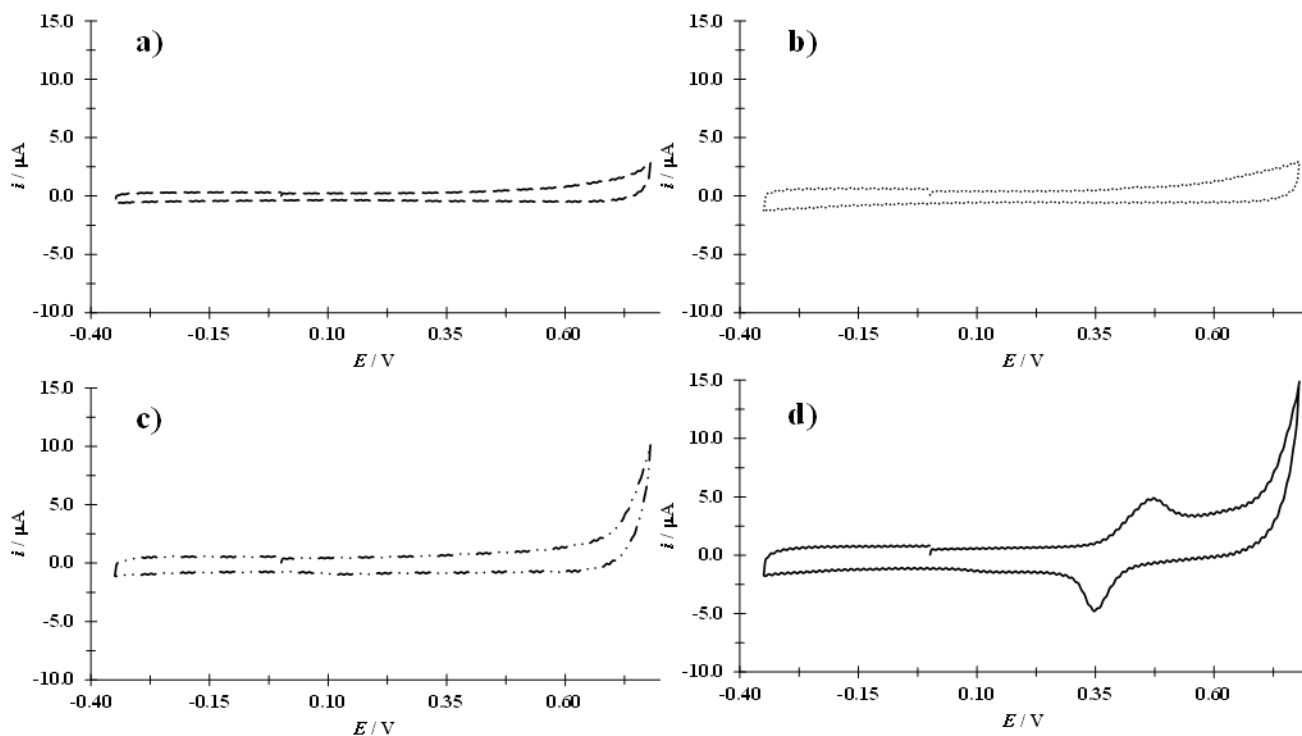


Figura G.1b Voltamperogramas cíclicos en el sistema CPE / 7.85 mM CD, (Buffer de fosfatos 0.1M, pH 7) en presencia: a) H₂Cz, b) H₂Afv, c) H₂Arf y d) H₂Qz en presencia de todas las dihidroxi-antraquinonas (27.5 μ M). En todos los casos el potencial de barrido comenzó en -0.4 V en dirección anódica a velocidades 0.8 Vs⁻¹

Este estudio revela que H₂Cz, H₂Arf y H₂Arf no presentan señal electroactiva, dando lugar a la cuantificación de H₂Qz. Para ello un estudio de voltamperometría Lineal (Figura G.1c) se llevó a cabo variando la concentración de H₂Qz. De la variación de la concentración vs i_{pa} se obtuvo una dependencia lineal (Figura G.1c) de la cual se obtuvieron parámetros analíticos reportados en la Tabla G.1b.

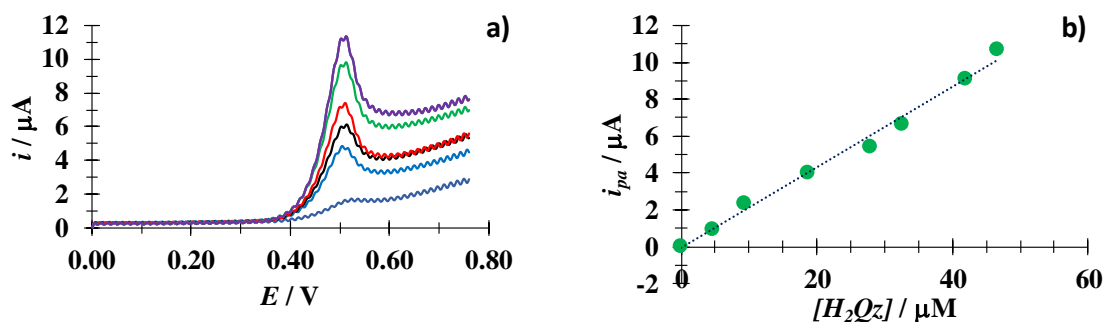


Figura G.1c Cuantificación H₂Qz en medio acuoso a partir de a) Voltamperometría lineal de con 2H β CD (7.85 mM) en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.00 el potencial inicial fue a 0 V en dirección anódica a velocidades de 0.80 Vs⁻¹ y b) Curva de calibración construida a partir de la variación de la i_{pa} a 0.512 V con respecto a la concentración de H₂Qz

Tabla G.1b. Comparación de parámetros analíticos reportados para la cuantificación electroquímica de H₂Qz utilizando diferentes electrodos

Electrodos	Medio	Sensibilidad / $\mu A \mu M^{-1}$	LOD / μM	LOQ / μM	Intervalo lineal / μM	Ref.
Electrodo de Pasta de Carbono	Acuoso pH 7	0.213 ± 0.006	3.129 ± 1.200	10.429 ± 1.133	0-36	Este Trabajo
Electrodos serigrafiados de Carbono	No-Acuoso DMF/CTAB	$0.035 \pm NR$	$0.27 \pm NR$	NR	0.50-6.00	[147]
Carbon Vítreo	Buffer Britton-Robinson con 30% acetonitrilo.	$0.72 \pm NR$	$0.41 \pm NR$	$1.38 \pm NR$	2-14	[148]

NR: No reportado

Podría ser la primera vez que la cuantificación de quinizarina en presencia de otras dihidroxi-antraquinonas ha sido reportado en medio acuoso, sin embargo, en la Tabla G.1b, se presenta una comparación de parámetros analíticos utilizando otros electrodos en la cuantificación individual de quinizarina en diferentes medios. El cual resulta ser competitivo con respecto a los reportados.

Anexo H. Protocolo QM-ORSA

QM-ORSA es una metodología basada en química cuántica para la evaluación de la actividad captadora de radicales libres, principalmente intenta proporcionar una forma universal cuantitativa de la evaluación de esta actividad para compuestos químicos, esto es, su actividad primaria [88]. Esta metodología surge del hecho de que no existe un método para la determinación de la capacidad antioxidante capaz de reflejar por complejo el perfil antioxidante de una molécula.

H.1 Actividad antioxidante primaria

La primera etapa de esta metodología fue realizar un estudio termodinámico tomando en cuenta tres mecanismos de reacción. Estos son: transferencia del formal del átomo de hidrógeno (HT), transferencia simple de electrón (SET) y formación del aducto radicalico (RAF).

Las reacciones SET se dan en una serie de pasos en el primer paso se transfiere un electrón del antioxidante al radical resultando la generación de un catión radicalico del antioxidante y un radical monoaniónico.



En el mecanismo SPLET (pérdida secuencial de transferencia de electrones) se da la transferencia del electrón por parte de la especie aniónica del antioxidante hacia el radical dando como resultado una especie radicalica del antioxidante y un radical con carga negativa.



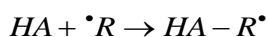
El mecanismo SPLET-d consiste en la generación de un anión radicalico a través de la transferencia de la especie dianiónica del antioxidante hacia el radical.



El segundo mecanismo involucrado es la transferencia del átomo de hidrógeno (HT) del antioxidante hacia el radical.



El tercer mecanismo es la formación del aducto radicalico (RAF) y consiste en la adición del radical hacia los diferentes sitios de la molécula antioxidante de interés.



Ec. H.1.e

H.2 Actividad captadora de radicales libres (RL) con QM-ORSA

Las energías libres de Gibbs (kcal/mol) cuyos mecanismos resultaron ser exergónicos se reportan en la Tabla H.2a. Además, se estudiaron todos los sitios posibles de reacción. Esto permite identificar los caminos y mecanismos de reacción más importantes en la actividad antioxidante de compuestos químicos, así como los productos de reacción más probables. Esta metodología permite obtener dos escalas diferentes de cuantificación, una absoluta basada en constantes de velocidad globales, y una relativa usando Trolox como referencia.

Tomando como modelo a la molécula de Quinizarina, se trazó una línea horizontal para mostrar los sitios enumerados que son equivalentes aprovechando la simetría de la molécula, de forma análoga se llevó a cabo para las demás DHAQ.

Por lo tanto, si nos ubicamos en el anillo di sustituido con los grupos OH, el sitio 1 es equivalente al sitio 4, el sitio 2 con el 3, el 13 con el 14 como se muestra en la Figura H.2a.

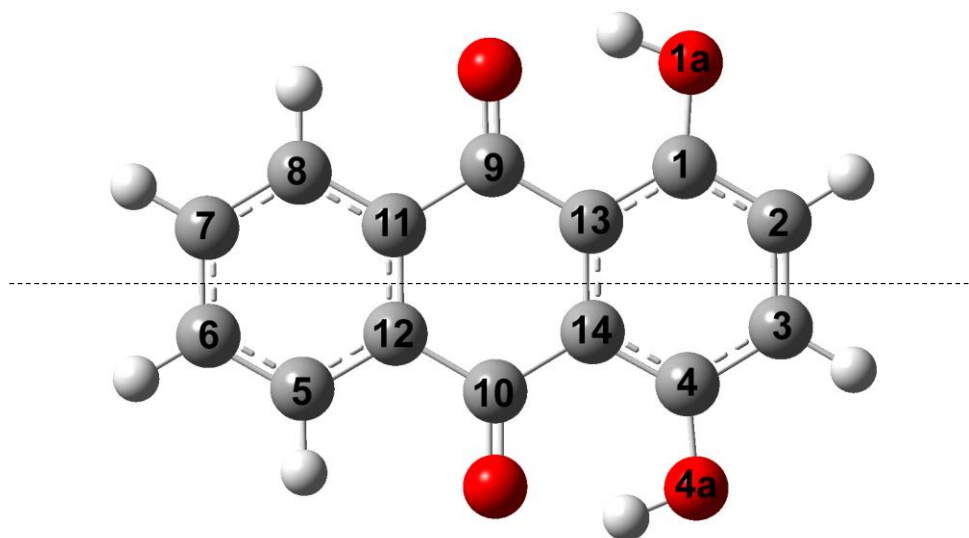


Figura H.2a Sitios enumerados y mecanismos de reacción de Quinizarina

Las reacciones RAF se llevan a cabo adicionando el radical en el enlace C=C, las reacciones HT, en los sitios 1a y 4a, donde se involucran los protones ionizables y las reacciones SET se dan cuando la molécula de quinizarina transfiere electrones hacia el radical, esta transferencia neutraliza al radical convirtiendo al antioxidante en un radical menos reactivo.

En el caso de la especie aniónica HQz⁻ se modelan todos los sitios de reacción RAF, ya que no se conserva la simetría de la molécula de Quinizarina.

La Tabla H2.a reporta las energías (kcal/mol) resultantes de tomar en cuenta los mecanismos anteriormente descritos y mostrando los sitios exergónicos para cada especie de DHAQ, estos se tomaron en cuenta para el estudio cinético.

Tabla H.2a. Energías de Gibbs en kcal/mol de DHAQ con el radical $\cdot\text{OOH}$

	Quinizarina			Crisazina			Antrarufina			Antraflavina		
	H ₂ Qz	HQz ⁻	Qz ²⁻	H ₂ Cz	HCz ⁻	Cz ²⁻	H ₂ Arf	HArf ⁻	Arf ²⁻	H ₂ Afv	HAfv ⁻	Afv ²⁻
RAF-1	8.05			14.98	14.91		15.67			-26.21	-5.60	8.57
RAF-2	7.44	-8.05	-1.64	6.33	5.88	-7.36	6.60	-9.11	-4.43	12.86		
RAF-3	7.44	11.13	-1.64	13.87	14.24	14.96	14.39	14.33	14.79	-25.12	2.47	9.66
RAF-4	8.05	-7.50		6.47	5.83	-5.87	7.50	-7.67	-1.86	-19.43	19.58	15.35
RAF-5	12.07	14.30	9.57	6.47	-7.41	-5.87	15.67	14.53		-26.21	10.34	8.57
RAF-6	12.34	13.16	10.43	13.87	13.27	14.96	6.60	8.05	-4.43	12.86	12.94	
RAF-7	12.34	12.07	10.43	6.33	-8.68	-7.36	14.39	13.81	14.79	-25.12	10.75	9.66
RAF-8	12.07	11.77	9.57	14.98			7.50	12.49	-1.86	-19.43	14.13	15.35
RAF-11	21.34	20.05	21.37	20.07	6.40	4.84	17.97	18.03	10.50	17.39	17.67	12.18
RAF-12	21.34	22.41	21.37	19.38	11.98	16.55	19.15	21.87	11.59	20.53	21.29	22.48
RAF-13	16.76	4.81	-0.08	20.07	17.44	4.84	19.15	4.86	11.59	20.53	23.99	22.48
RAF-14	16.76	11.22	-0.08	19.38	17.22	16.55	17.97	15.27	10.50	17.39	10.28	12.18
HT-1	-1.19			4.97			4.99					
HT-2										1.06		
HT-4	-1.19	-14.59										
HT-5							4.99	3.32				
HT-6										1.06	0.20	
HT-8				4.97	9.10							
SET	35.23	28.03	-6.94	51.95	17.61	14.78	53.75	16.96	18.62	54.56	17.27	19.49

Las constantes de velocidad para los caminos exergónicos resultantes del estudio termodinámico se calcularon utilizando la teoría del estado de transición [149] en estado estándar 1 M, incluyendo correcciones de tunelaje.

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT} \quad \text{Ec. H.2a}$$

Donde k_B y h son las constantes de Boltzman y Planck, T es la temperatura en K y ΔG^\ddagger es la energía libre de Gibbs de activación, la cual se calculó como la diferencia entre la energía en el estado de transición y la energía de los reactivos. Las energías de activación calculadas se muestran en la Tabla H.2b

Tabla H.2b Energías de activación en kcal/mol de DHAQ en medio acuoso con radical $\cdot\text{OOH}$

	Quinizarina			Crisazina		Antrarufina		Antraflavina	
	H ₂ Qz	HQz ⁻	Qz ²⁻	HCz ⁻	Cz ²⁻	HArf ⁻	Arf ²⁻	HAfv ⁻	Afv ²⁻
RAF-1								16.34	17.01
RAF-2		15.94	10.01		16.16	16.61	16.85		
RAF-3			10.01						
RAF-4		12.73			14.18	16.42	16.56		
RAF-5				15.95	14.18				17.01
RAF-6							16.85		
RAF-7				16.87	16.42				
RAF-8							16.56		
RAF-13			11.44						
RAF-14			11.44						
HT-1	25.78								
HT-4	25.78	0.00							
HT-6								25.08	
SET			1.55						

Las barreras energéticas mostradas en la Tabla H1.b muestran una disminución energética para las especies de Quinizarina y Crisazina para el mecanismo RAF y HT (quinizarina), un aumento de la barrera de energía es observado para

Antraflavina y Antrarufina. Las geometrías optimizadas de los estados de transición se muestran en las figuras H2.b (quinizarina), H2.c (crisazina), H2.d (antrarufina) y H2.e (antraflavina).

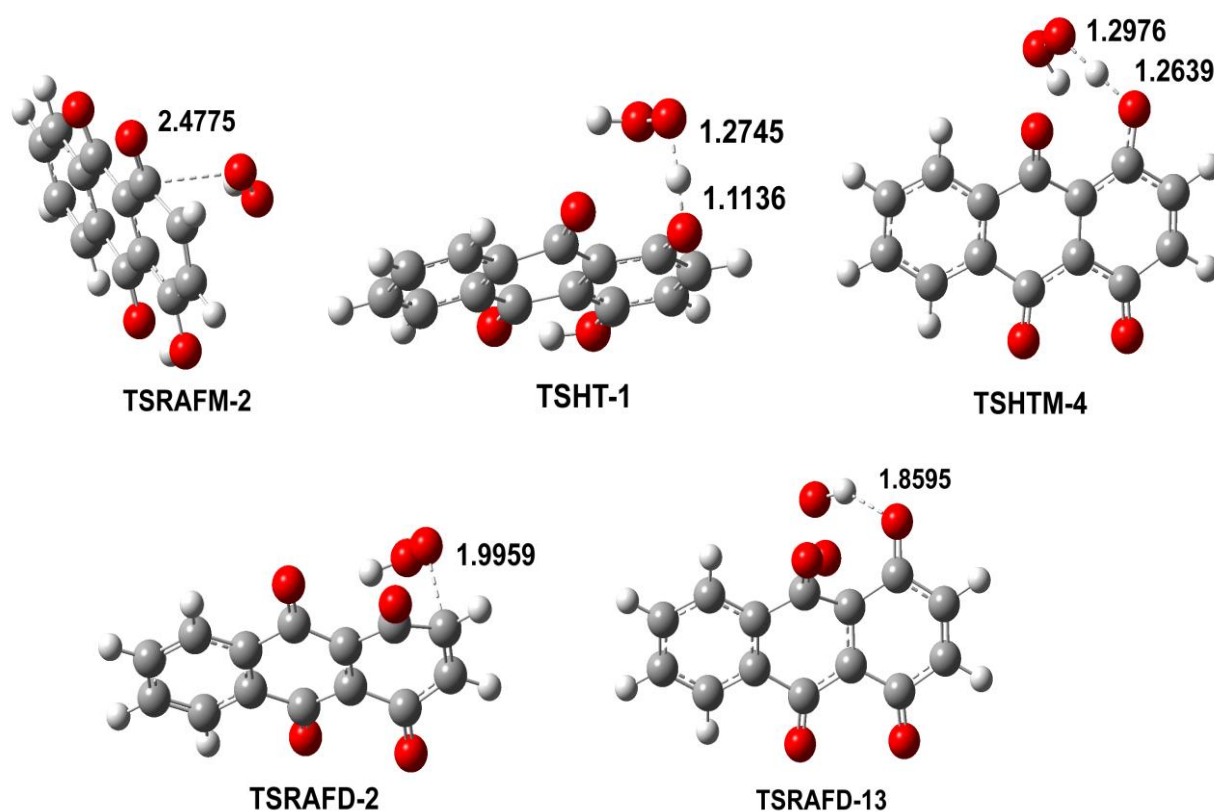


Fig. H.2b Estados de transición de especies de Quinizarina calculadas con el funcional M06-2X, el conjunto de base 6-311 ++ G (d,p) y modelo del solvente SMD en agua. Las distancias están reportadas en Å.

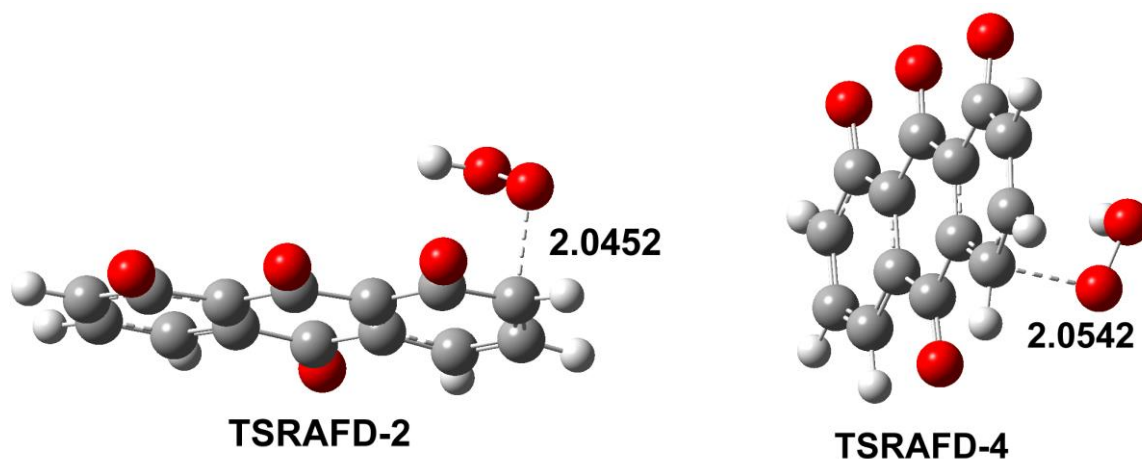


Fig. H.2c Estados de transición de especies de Crisazina calculadas con el funcional M06-2X, el conjunto de base 6-311 ++ G (d,p) y modelo del solvente SMD en agua. Las distancias están reportadas en Å.

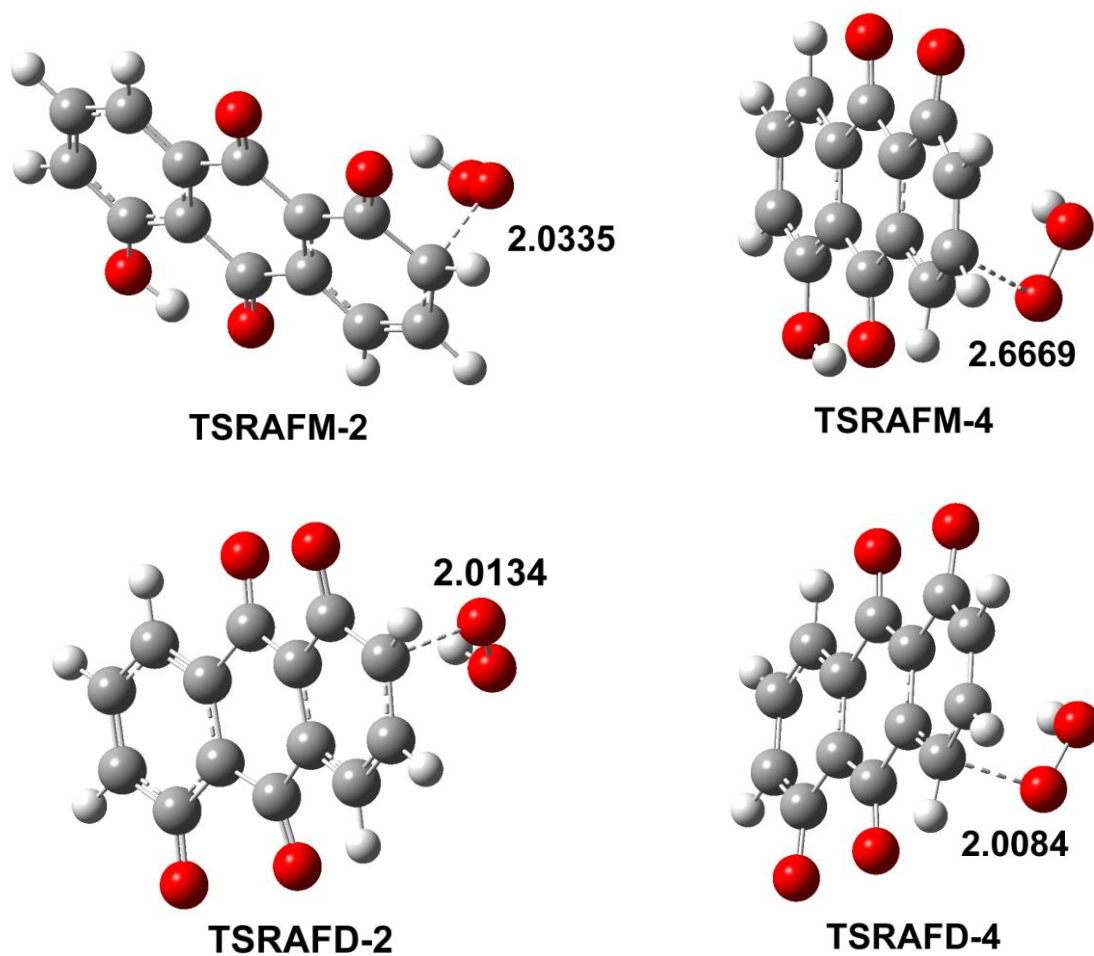


Fig. H.2d Estados de transición de especies de Antrarufina calculadas con el funcional M06-2X, el conjunto de base 6-311 ++ G (d,p) y modelo del solvente SMD en agua. Las distancias están reportadas en Å.

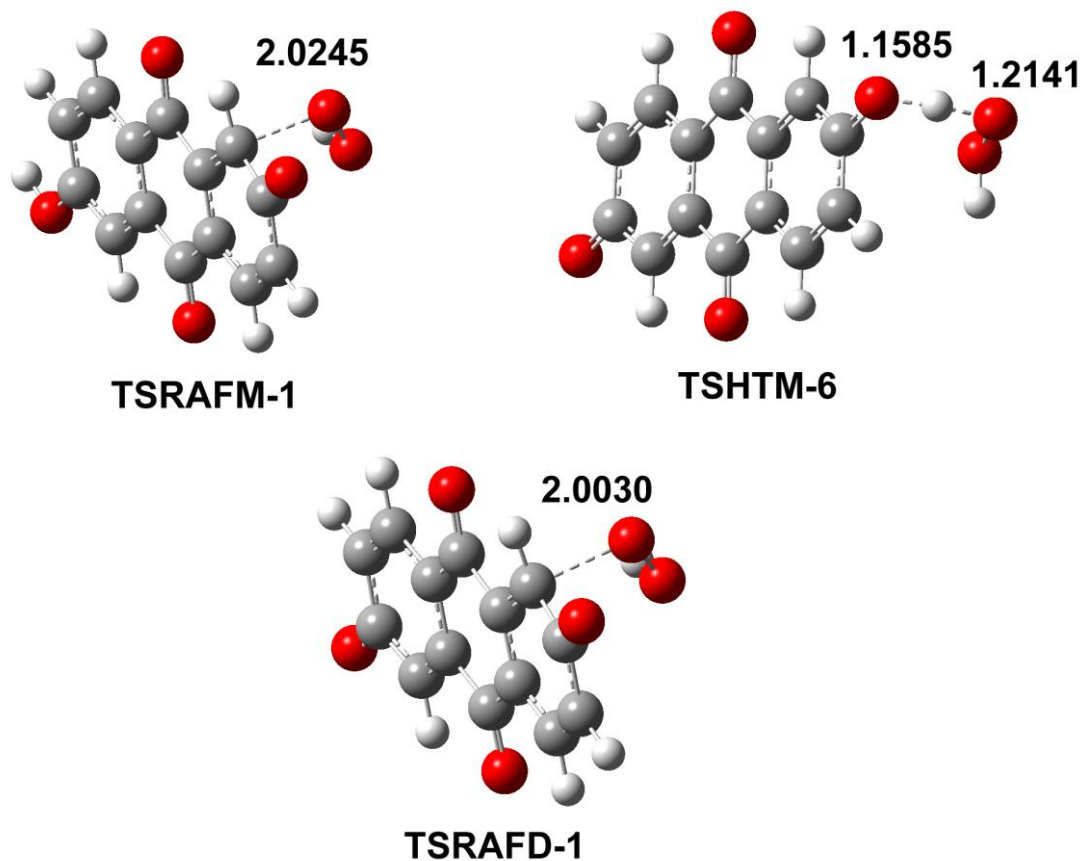


Fig. H.2e Estados de transición de especies de Antraflavina calculadas con el funcional M06-2X, el conjunto de base 6-311 ++ G (d,p) y modelo del solvente SMD en agua. Las distancias están reportadas en Å.

En el caso de reacciones SET la energía libre de Gibbs de activación se calcula utilizando la teoría de Marcus [104] la cual está escrita en términos de dos parámetros termodinámicos, la energía de reacción ΔG^0_{SET} , y la energía de reorganización nuclear (λ):

$$\Delta G^\ddagger_{SET} = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G^0_{SET}}{\lambda} \right)^2 \quad \text{Ec. H.2b}$$

Donde λ se calcula como la diferencia de energías entre ΔE_{SET} y ΔG^0_{SET} el primer término se calculó como la diferencia entre reactivos y productos verticales y el segundo término es la energía no adiabática.

$$\lambda = \Delta E_{SET} - \Delta G^0_{SET} \quad \text{Ec. H2.c}$$

Además, las constantes de velocidad cercanas al límite por difusión no se pueden obtener directamente de cálculos TST, sino que tienen que ser corregidas. Para ello se utiliza la Teoría de Collins-Kimball [150] en conjunto con el estado estacionario de Smoluchowski [151] para un sistema de reacción irreversible bimolecular controlado por difusión y el enfoque Stokes-Einstein [152].

$$k_{app} = \frac{k_D k}{k_D + k} \quad \text{Ec. H2.d}$$

Y

$$k_D = 4\pi R_{AB} D_{AB} N_A \quad \text{Ec. H2.e}$$

Donde

$$D_{A o B} = \frac{k_B T}{6\pi\eta\sigma_{A o B}} \quad \text{Ec. H2.f}$$

Los valores de los coeficientes de velocidad totales para reacciones HT se calcularon como la suma de cada mecanismo de reacción.

$$k^{HT} = k_{app}^1 + k_{app}^2 + \dots + k_{app}^n \quad \text{Ec. H2.g}$$

Los coeficientes globales se calcularon tomando en cuenta las fracciones molares de cada especie al pH de interés involucradas en cada ruta de reacción (Tabla H.2c).

$$k_{global} = f_{neutra} k_{tot}^{HT} + f_{anión} k_{tot}^{SET} \quad \text{Ec. H2.h}$$

En la Tabla H.2d se reportan las constantes de velocidad totales y globales a 298 K en $M^{-1} s^{-1}$ para las DHAQ en medio acuoso con el radical $\cdot OOH$. Las constantes de velocidad globales se obtuvieron tomando en cuenta las fracciones molares a pH fisiológico presentadas en la Tabla H.2c. Las fracciones molares fueron calculadas a partir de las constantes de acidez presentadas en la sección 4.4.

Tabla H.2c. Fracciones molares de las especies de DHAQ a pH fisiológico

<i>DHAQ</i>	<i>f(H₂AQ)</i>	<i>f(HAQ⁻)</i>	<i>f(AQ²⁻)</i>
Antraflavina	5.20 x 10 ⁻¹	4.43 x 10 ⁻¹	3.68 x 10 ⁻²
Antrarufina	9.99 x 10 ⁻¹	2.95 x 10 ⁻⁴	2.40 x 10 ⁻⁹
Crisazina	9.56 x 10 ⁻¹	4.44 x 10 ⁻²	9.56 x 10 ⁻¹
Quinizarina	9.99 x 10 ⁻¹	3.71 x 10 ⁻⁴	8.71 x 10 ⁻⁹

Tabla H.2d. Constantes de velocidad totales a 298 K en $M^{-1}s^{-1}$ en medio acuoso de DHAQ con el radical $\cdot OOH$

	Quinizarina			Crisazina		Antrarufina		Antraflavina	
	H ₂ Qz	HQz ⁻	Qz ²⁻	HCz ⁻	Cz ²⁻	HArf ⁻	Arf ²⁻	HAfv ⁻	Afv ²⁻
RAF-1								5.66E+04	1.81E+04
RAF-2		1.17E+05			7.48E+04	3.83E+04	2.40E+04		
RAF-3									
RAF-4		2.61E+07			2.05E+06	5.17E+04	3.85E+04		
RAF-5				1.15E+05	2.05E+06				1.81E+04
RAF-6							2.40E+04		
RAF-7				2.55E+04	7.48E+04				
RAF-8							3.85E+04		
RAF-13			1.68E+08						
RAF-14			1.68E+08						
HT-1	14.73								
HT-2									
HT-4	14.73	2.80E+09							
HT-5									
HT-6								7.00	
HT-8									
SET			6.88E+09						
K _{total}	29.46	2.83E+09	7.21E+09	1.41E+05	4.25E+06	8.99E+04	1.25E+05	5.66E+04	3.63E+04
K _{global}		1.05E+06			6.25E+03		2.65E+01		2.64E+04

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla H.2d los procesos más rápidos corresponden a los procesos SET y HT en el sitio 4 para la especie aniónica de quinizarina. En el caso de Antrarufina el proceso más rápido corresponde a la transferencia del átomo de hidrógeno de la especie aniónica este mismo comportamiento se observa para Antraflavina y Crisazina.

Otra de las ventajas de la metodología QM-ORSA es que permite la comparación de las constantes de velocidad de moléculas con actividad antioxidante con otras moléculas que se ha demostrado que exhiben esta propiedad, esta comparación se expresa como un valor relativo a Trolox r^T .

$$r^T = \frac{k_{global}}{k_{global}^{Trolox}} \quad \text{Ec. H2.i}$$

Donde k_{global} es el coeficiente de la velocidad global del captamiento del radical libre de interés, y k_{global}^{Trolox} es el coeficiente de la velocidad de Trolox bajo las mismas condiciones. La constante de velocidad global para Trolox con el radical $\cdot\text{OOH}$ [153] corresponde a $8.96 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabla H.1e Valores relativos a Trolox de las DHAQ en medio acuoso con radicales $\cdot\text{OOH}$

	Quinizarina	Crisazina	Antrarufina	Antraflavina
r^T	11.71	6.98×10^{-2}	2.96×10^{-4}	2.95×10^{-1}

Comúnmente en la práctica se compara la actividad antioxidante de una molécula con respecto a un antioxidante de referencia como Trolox. Entonces la capacidad antioxidante relativa puede ser expresada como r^T veces más bajo o alto que Trolox. En la Tabla H.1d se muestra una tendencia en la captura de este radical de mayor a menor: Antraflavina > Crisazina > Quinizarina > Antrarufina. Se ha demostrado que el mecanismo principal por el cual se lleva a cabo la captura del radical $\cdot\text{OOH}$ en los compuestos fenólicos es por medio de HT lo cual se comprobó con la metodología QM-ORSA, lo que sugiere que Antraflavina al no tener una interacción directa de los grupos hidroxilos fenólicos con los grupos carboxílicos C=O que conforman a la quinona puede transferir con mayor facilidad el átomo de hidrógeno con respecto a las demás DHAQ y es por ello que



muestra una mayor actividad antioxidante. Los bajos valores de TEAC se deben a que la posición meta de estas estructuras, las cuales no favorecen la actividad antioxidante primaria.



Dyes and Pigments
Volume 184, January 2021, 108641



Quinizarin characterization and quantification in aqueous media using UV-VIS spectrophotometry and cyclic voltammetry

A.K. Rivas-Sánchez ^a, D.S. Guzmán-Hernández ^b, M.T. Ramírez-Silva ^a  , M. Romero-Romo ^c, M. Palomar-Pardavé ^c

