



**CENTRO DE INVESTIGACION EN MATERIALES  
AVANZADOS, S.C.  
POSGRADO**

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DEL MECANISMO  
ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES  
QUERCETINA, (+)-CATEQUINA Y CIANIDINA,  
BASADO EN SU SECUENCIA DE  
DESPROTONACIÓN**

Tesis que Como Requisito para Obtener el Grado de Doctor en  
Ciencias en Materiales Presenta:

**ANA MARIA MENDOZA WILSON**

**Dr. DANIEL GLOSSMAN MITNIK**  
Director de Tesis

Chihuahua, Chihuahua

Noviembre del 2006

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIMAV, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.

## DEDICATORIAS

A la parte esencial de mi vida.....mi familia

A mi esposo René, quién con su amor, paciencia y entrega ha logrado sensibilizar todo mi ser y ganarse mi amor y respeto.

A quienes representan el amor más sublime y eterno sobre la tierra, mis hijos Luis Fernando y Renata.

A mi madre Francisca, una gran mujer de espíritu admirable y fuerza inagotable.....gracias por tu ejemplo.

A l enorme equipo formado por mis hermanos, hermanas, cuñadas, cuñados y mis sobrinos.

Con Amor y Respeto a la memoria de mi padre Manuel y mi hermano Francisco.

A mis amigos Mauro y Arturo.

Al amigo que siempre me acompaña.....DIOS

.....A todos ellos los AMO!

Ana María

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradezco al Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. por todas las facilidades brindadas para el desarrollo de este trabajo y muy especialmente a su valioso equipo humano:

Al Dr. Daniel Glossman Mitnik, por contribuir en mi formación profesional, su apoyo, confianza y al distinguirme como parte de su equipo de colaboradores, del cual deseo seguir formando parte.....Gracias Doctor!

Al NANOCOSMO-Grupo de Modelado Computacional de Moléculas y Nanomateriales, dirigido por el Dr. Glossman e integrado por Norma Flores, Luz María Rodríguez, Alejandra Fávila, Marco Gallo, Mónica alvarado, Isis Rodríguez, Erika López, Diana Barraza y Cecilia Ruiz, por los momentos compartidos.

Al Lic Federico Stockton Rejón, quién me abrió las puertas de CIMAV de par en par, gracias por creer en mí.

A los miembros de mi comité evaluador y tutorial, Dr Erasmo Orrantia y Alberto Martínez, por acompañarme semestre tras semestre en los avances de mi trabajo, y a quienes les he tomado cariño y respeto.

Al comité evaluador en mi defensa de tesis integrado por: Dr. Juvencio Robles, Dr. Alejandro Camacho y Dr. Francisco Espinosa.

Al dúo dinámico integrado por Claudia y Carmelita, un par de chicas muy capaces y serviciales del departamento de computo.

A todo el grupo de cómputo, especialmente a Luis Licón.

A Elvira Tavares, Alexis Castillo y Carlitos, por su atención siempre cordial.

A Mary Mendoza por su amistad y buena disposición.

Al Ing. Enrique Torres, al M.C: Daniel Lárdizabal, M.C. Verónica Gallegos y al Dr. Audel Santos, buenos amigos y compañeros de trabajo.

Al Dr. Armando Zaragoza por su disposición en apoyar mi trabajo.

Extiendo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo académico y económico, gracias a los cuales he logrado cumplir con uno de mis objetivos en mi superación académica.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por su apoyo en mi superación personal y académica, y del cual me siento parte intrínseca. Hago una distinción especial para el Dr. Inocencio Higuera, Dr. Reginaldo Báez, Dr. Alfonso Gardea, Dr. Martín Esqueda y la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, por brindar las facilidades para mi desarrollo profesional y permitirme seguir formando parte de su comunidad científica y familiar.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
Hipótesis.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Particulares.....	8
ANTECEDENTES.....	9
Flavonoides.....	9
Estructura Química.....	9
Solubilidad.....	13
Actividad Antioxidante.....	14
Actividad Prooxidante.....	19
Química Computacional.....	20
Conceptos y Fundamentos Básicos.....	21
Métodos de Estructura Electrónica.....	30
Químicas Modelo.....	42
Propiedades Moleculares.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
Teoría y Detalles Computacionales.....	56
Etapa I.....	57
Etapa II.....	59
Sección Experimental.....	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
Selección de la Química Modelo.....	67
Etapa I.....	68
Optimización de Geometría de las Moléculas Neutras.....	68
Propiedades Electrónicas de las Moléculas Neutras.....	81
Etapa II.....	94
Propiedades Termoquímicas.....	94
Propiedades de RMN.....	106
Formación de Quinonas, Propiedades Eléctricas y Secuencia de Desprotonación.....	113
CONCLUSIONES.....	129
Contribuciones Científicas.....	131
PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	132
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	134
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXO Artículos Publicados.....	150

## RESUMEN

Dentro de los flavonoides más abundantes en los tejidos vegetales y con mayor potencial antioxidante se encuentran quercetina, (+)-catequina y cianidina. La carencia en el conocimiento del mecanismo antioxidante de estos compuestos, limita su uso potencial, tanto a nivel biológico y comercial. Los avances generados hasta el momento, han demostrado que los flavonoides operan a través de la inhibición de especies de oxígeno reactivo (ROS) que tienen actividades como radicales libres. Presuntamente el mecanismo está basado en reacciones de abstracción de hidrógeno (desprotonación) de sus grupos OH, donde la ruta es trazada por la secuencia de desprotonación y los intermediarios formados. Debido a que los flavonoides son sistemas químicos complejos, las técnicas experimentales se han enfrentado con serias limitaciones para su estudio a niveles de estructura electrónica. Por ello ha sido necesario recurrir al empleo de herramientas alternativas, donde la química computacional ha resultado efectiva. El objetivo de este trabajo fue determinar la secuencia de desprotonación en las moléculas de quercetina, (+)-catequina y cianidina, basados en la estructura y propiedades moleculares de sus intermediarios, con la finalidad de contribuir en el esclarecimiento de su mecanismo antioxidante, empleando DFT bajo simulación de condiciones fisiológicas. Se utilizó una química modelo desarrollada en nuestro laboratorio para sistemas heterocíclicos conocida como CHH(medium)-DFT. Los intermediarios formados se establecieron tomando como base los sitios reactivos señalados por índices de Fukui, filicidad local y filicidad grupal. La secuencia de desprotonación fue establecida en base a la facilidad de donación de los átomos de hidrógeno de cada uno de los grupos OH presentes en las moléculas de flavonoides, así como los grupos CH sugeridos por las pruebas de reactividad. Para ello se determinaron entalpías de disociación de enlace, potenciales de ionización, constantes de apantallamiento de  $^{13}\text{C}$  por RMN, polarizabilidades y energías moleculares totales. Los resultados demuestran que la simulación de agua como solvente, incrementa ligeramente la estabilidad de los flavonoides en su estado neutro, a la vez que favorece su potencial antioxidante, y altera la prioridad de los distintos grupos funcionales como sitios reactivos, comparada con la fase de gas. Se encontró que la secuencia de desprotonación es totalmente dependiente de la estructura y propiedades moleculares del flavonoide, así como de los intermediarios formados, de acuerdo al mecanismo seguido para la transferencia del átomo de hidrógeno. La secuencia de desprotonación de quercetina siguiendo un mecanismo homolítico fue:  $3\text{-OH} \geq 4'\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 8\text{-CH}$  y mediante el mecanismo heterolítico de aniones:  $4'\text{-OH} > 5\text{-OH} > 7\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 3\text{-OH}$ . En el caso de (+)-catequina la desprotonación siguió otro orden, por medio del mecanismo homolítico fue:  $4'\text{-OH} > 7\text{-OH} > 5\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 2\text{-CH} > 4\text{-CH}'$  y por mecanismo heterolítico de radicales cationes:  $8\text{-CH} > 2'\text{-CH}$ . Finalmente la desprotonación de cianidina indica otra secuencia, el mecanismo homolítico:  $3\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 4'\text{-OH} > 4\text{-CH}$  y el mecanismo heterolítico de aniones:  $4'\text{-OH} > 5\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 3\text{-OH}$ .

## ABSTRACT

Quercetin, (+)-catechin, and cyanidin, are among the more abundant flavonoids in plant tissues and are also those with the most antioxidant potential. The lack of knowledge about the antioxidant mechanism of such compounds is a limitant for their potential use at both biological and commercial level. The advances generated until now have shown that flavonoids operate through the inhibition of reactive oxygen species (ROS), which have free radical activities. Presumably the mechanism is based on hydrogen abstraction reactions (deprotonation) of their OH groups, where the pathway is laid out by both the deprotonation sequence and the intermediate formed. Because the flavonoids are complex chemical systems, experimental methods have faced serious limitants for their study at the electronic structure level. For that reason, it has become necessary to turn to alternative tools, and among those, computational chemistry has shown to be effective. The objective of this work was to determine the deprotonation sequence in the molecules of quercetin, (+)-catechin, and cyanidin on the basis of the structure and molecular properties of their intermediates. The purpose was to contribute into the elucidation of their antioxidant mechanism by using DFT under simulation of physiological conditions. A model chemistry developed in our laboratory was used for heterocyclic systems, known as CHIH(medium)-DFT. The intermediates formed were established by taking account the reactive sites suggested by Fukui indices, local philicity, and group philicity. The deprotonation sequence was established on the basis of the easiness of donation of the hydrogen atoms of each of the OH groups in the flavonoid molecules, as well as the CH groups suggested by the reactivity tests. For such a purpose were determined bond dissociation enthalpies, ionization potentials,  $^{13}\text{C}$  RMN shielding constants, polarizabilities, and total molecular energies. The results show that the aqueous simulation of the solvent increases slightly the stability of flavonoids in their neutral state, at the same time that favours their antioxidant potential and alters the priority of the distinct functional groups as reactive sites, in comparison with the gas phase. It was found that the deprotonation sequence is totally dependent of the structure and molecular properties of the flavonoid, as well as of the formed intermediates, according with the followed mechanism for the transfer of the hydrogen atom. The deprotonation of quercetin by a homolytic mechanism was:  $3\text{-OH} \geq 4'\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 8\text{-CH}$ , and by means of the anion heterolytic mechanism:  $4'\text{-OH} > 5\text{-OH} > 7\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 3\text{-OH}$ . For (+)-catechin, the deprotonation followed another order, by means of the homolytic mechanism was:  $4'\text{-OH} > 7\text{-OH} > 5\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 2\text{-CH} > 4\text{-CH}'$ , and by radical cation heterolytic mechanism:  $8\text{-CH} > 2'\text{-CH}$ . Finally, the cyanidin deprotonation indicates another sequence, the homolytic mechanism:  $3\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 4'\text{-OH} > 4\text{-CH}$ , and the anion heterolytic mechanism:  $4'\text{-OH} > 5\text{-OH} > 3'\text{-OH} > 3\text{-OH}$ .



## INTRODUCCION

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular, son muy abundantes en los tejidos vegetales y presentan una gran diversidad de propiedades biológicas esenciales para los seres vivos [Pietta, 2000]. En el organismo humano muestran la capacidad de interaccionar directamente con DNA, enzimas, ácidos grasos, carbohidratos, receptores de membrana y con genes de regulación. Por otra parte, atraviesan la barrera hematoencefálica, estimulan el sistema inmune, poseen actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiestrogénica, antiinflamatoria, antialérgica y regulan la permeabilidad capilar [Steinmetz y Potter, 1996; Miesan y Mohamed, 2001; Burda y Oleszek, 2001; Martínez, et al., 2002; y Erkoc, et al., 2003]. Por su capacidad antioxidante endógena se les atribuyen efectos benéficos en el tratamiento de enfermedades graves, donde el mecanismo oxidativo es sustancial para su desarrollo, por ejemplo, los padecimientos cardíacos, cáncer, HIV, Alzheimer y Parkinson [Olivero y Pacheco, 2002; y Fukuhara, et al., 2002]. Estas propiedades confieren a los flavonoides aplicaciones potenciales importantes en las áreas médicas y farmacológicas.

En los tejidos vegetales, los flavonoides forman parte de la estructura que les brinda el soporte mecánico (cutícula), los protegen contra microorganismos patógenos, participan en asociaciones simbióticas con microorganismos para la fijación de nitrógeno, actúan como sustancias de reserva y también presentan actividad antioxidante [Zaprometov, 1992; y Broughton, et al., 2003]. Se ha demostrado que por su poder antioxidante, los flavonoides evitan la degradación de nutrientes en vegetales y frutos que son irradiados para su preservación [Tamba y Torreggiani, 2004]. Estas propiedades permiten prolongar la vida útil de frutos y hortalizas, lo cual resulta de gran relevancia desde el punto de vista económico y nutricional, para las áreas agrícola y alimentaria.

De las 8,000 especies individuales de compuestos fenólicos que se conocen hasta el momento, quercetina y (+)-catequina son a los que más frecuentemente se les encuentra formando parte de los tejidos vegetales. También son los que representan una de las mayores fracciones del total y los que han mostrado un mayor potencial antioxidante [Pietta, 2000; y Scalbert y Williamson, 2000]. Para el caso de cianidina se ha observado una tendencia similar, pero en vegetales rojos y púrpura ya que aparte de su función antioxidante actúan como pigmentos [Seeram y Nair, 2002; y Einbond, et al., 2004].

Actualmente existe mucha evidencia que demuestra el potencial antioxidante *in vitro* de estos compuestos, pero poco es conocido acerca de su eficiencia *in vivo* [Ross y Kasum, 2002]. El mecanismo específico mediante el cual los flavonoides ejercen su actividad antioxidante, aún no ha sido establecido.

Desde mediados de los años noventa a la fecha se han desarrollado muchos trabajos en el campo experimental de la investigación, con la finalidad de establecer dicho mecanismo, pero no se ha logrado, en parte por efecto de

la variabilidad en los datos generados. Para la realización de estudios *in vitro* se utilizan muestras en el estado sólido y en solución. La manera ideal de analizarlas es en solución para simular las condiciones fisiológicas de los organismos vivos; sin embargo, las soluciones se preparan a partir de muestras sólidas, y es aquí donde surge el primer inconveniente.

La purificación de quercetina, (+)-catequina y cianidina a partir de extractos vegetales, resulta difícil y costosa especialmente para cianidina; por la dificultad que implica separarlos de vitaminas, carbohidratos y proteínas con las que son compatibles por polaridad [Degenhardt, et al., 2000; y Einbond et al., 2004]. En el estado sólido comercial cianidina es preparada como cloruro o bromuro monohidratado y también en forma no hidratada. Cada miligramo (mg) de cloruro de cianidina no hidratado con un 90% de pureza (grado HPLC), cuesta alrededor de \$42.00 dólares [Fluka, 2005/2006].

(+)-catequina es menos cara que cianidina y comercialmente también existe en forma de cristales monohidratados y no hidratados. Sin embargo, a medida que incrementa su grado de pureza, incrementa notablemente su costo: 1 g con 98% de pureza cuesta alrededor de \$11.00 dólares (0.011 dólares el mg), mientras que 1 mg con más del 99% de pureza (HPLC) incrementa su costo hasta \$36.00 dólares, es decir el costo por mg se eleva en un 3,000% [Sigma, 1999; y Fluka, 2005/2006].

Quercetina comercialmente existe como cristales dihidratados y no hidratados, es la menos cara de los tres flavonoides. Aunque su costo también se eleva con el grado de pureza. El gramo de quercetina dihidratada con 95% de pureza cuesta cerca de \$1.0 dólar, el gramo con 98% de pureza se eleva a \$2.0 dólares, mientras que el mg con más del 99% de pureza (HPLC) puede llegar a costar \$400.00 dólares [Sigma, 1999; y Fluka, 2005/2006].

En los flavonoides, la pureza no solo consiste en la eliminación total de los residuos de otros compuestos que los acompañan, sino también de la mezcla de confómeros que se presentan del mismo flavonoide. En un estudio reciente realizado por, Olejniczak y Potrzebowski, (2004), se ha demostrado que dichas mezclas pueden tener repercusiones en algunas de las propiedades medidas, sean del tipo químico, físico, magnético o termoquímico, y esta puede ser una de las causas que da origen a la variabilidad de datos experimentales al estudiar la relación: propiedades antioxidantes – estructura. Ellos demostraron en quercetina, que las muestras que se venden en diferentes casas comerciales, varían en pureza debido a la presencia de mezclas de confómeros, lo cual conduce a diferentes resultados aún cuando comercialmente se está hablando del mismo tipo de muestra.

Varias fuentes bibliográficas [Yin, et al., 1990 y Olejniczak y Potrzebowski, 2004], reportan que en el estado sólido quercetina, (+)-catequina y cianidina existen como cristales hidratados y anhidros con dos conformaciones: anti y Syn, donde las orientaciones de los grupos hidroxilos, preferentemente del anillo B, cambian ante la presencia o ausencia de agua dentro de la red cristalina. Por esta razón la mezcla de cristales hidratados y no hidratados en una muestra sólida de cada uno de estos flavonoides, indica la existencia de por lo menos cuatro confómeros, que dependiendo de su

porcentaje de abundancia, determinan las características del compuesto analizado.

Los cinco grupos hidroxilos que poseen los flavonoides estudiados, son susceptibles a interaccionar con moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno, por lo que pueden existir también como cristales tri- o tetrahidratados, aunque en menor proporción, ya que las formas monohidratadas y dihidratadas son las más estables [Tatsuhiko et al, 1985 y Jin, et al., 1990]. Una variante mas, es con cual de los hidroxilos se enlazan las moléculas de agua en el caso de estar presente una o dos, ya que tienen cinco sitios posibles.

Otra problemática que se enfrenta durante el estudio de los flavonoides, pero en este caso en fase de solución, es encontrar el solvente adecuado. Los flavonoides son compuestos anfipáticos difíciles de solubilizar en su totalidad; además son tan susceptibles a la oxidación que el propio solvente puede oxidarlos fácilmente, por lo que la elección del solvente adecuado puede volverse una tarea complicada [Burda y Oleszek, 2001 y Codorniu, et al., 2003]. La solubilidad de los distintos flavonoides varía con su estructura, el tipo de solvente, así como también con el pH de la solución. Los flavonoides son mas solubles a pH alcalino, de tal manera que los estudios experimentales *in vitro* donde son simuladas las condiciones fisiológicas: cercanas a pH neutro (7.4) en el organismo humano y pH ácido a neutro (5.0 - 7.5) en los vegetales, pueden ver afectados sus resultados [Salisbury y Ross, 1994].

Los avances experimentales generados hasta el momento, han permitido comprobar que la actividad antioxidante de los flavonoides opera a través de la inhibición de especies de oxígeno reactivo (ROS) que tienen actividad como radicales libres. Los flavonoides pueden intervenir en etapas tempranas inactivando enzimas (nucleófilos) o quelando metales (electrófilos), evitando así la formación de los ROS, o bien en etapas tardías inhibiendo los ROS ya formados (radicales libres). Por su gran capacidad de donar electrones los flavonoides son ideales para ataque electrofílico y radical; sin embargo, por los efectos de polarización de cargas gracias a su sistema de electrones  $\pi$ , colateralmente pueden ser sitio de ataque nucleofílico. Las regiones moleculares para ataque nucleofílico son escasas y bien localizadas, pero para ataque electrofílico y radical, ofrecen muchos sitios posibles. El mecanismo central para reaccionar con electrófilos y radicales presuntamente esta basado en reacciones de abstracción de hidrógeno [Pietta, 2000] conocidas también como reacciones de desprotonación, y son procesos energéticos conectados con la transferencia directa o indirecta de átomos de hidrógeno [Trouillas, et al., 2006].

De acuerdo a Jovanovic, et al., (1994), los flavonoides ejercen su actividad antioxidante mediante un máximo de dos electrones ó átomos de hidrógeno transferidos. La transferencia directa de un átomo de hidrógeno de la molécula de flavonoide hacia el receptor, da lugar a la formación de un radical fenoxilo ( $\text{ArO}^{\bullet}$ ), mientras que la transferencia indirecta da lugar a la formación de un radical catión ( $\text{ArO}^{\bullet+}$ ) si se dona primero el electrón, o un anión fenóxido ( $\text{ArO}^{-}$ ) si se dona primero el protón. Independientemente del ion formado, el

intermediario final de la primera desprotonación es una semiquinona o radical fenoxilo, mientras que si se donan dos átomos de hidrógeno se obtiene una quinona que es lo mismo que un dirradical fenoxilo.

Para conocer el mecanismo de reacción a través del cual los flavonoides ejercen su actividad antioxidante, es imprescindible conocer la secuencia de desprotonación, basada en la facilidad para donar los átomos de hidrógeno de cada uno de los enlaces O-H y C-H. Apoyados en que los átomos que primero se desprotonan son los que primero reaccionarán frente a electrófilos y radicales libres. Para ello se requieren conocer a fondo las propiedades intrínsecas de la estructura molecular de los intermediarios formados.

Los principales factores dependientes de la estructura química que determinan la facilidad con que un átomo de hidrógeno puede ser liberado [Suryan, et al., 1989] se agrupan en:

#### 1. Termoquímicos

a). La energía requerida para la ruptura homolítica (transferencia directa) del átomo de hidrógeno a partir de un enlace O-H ó C-H, la cual es denominada energía ó entalpía de disociación de enlace (BDE).

b). La energía requerida para la ruptura heterolítica del enlace (transferencia indirecta), la cual generalmente se mide como potencial de ionización (IP).

#### 2. Cinéticos

a). Velocidad de reacción, controlada por efectos polares, el tipo, número y posición de los sustituyentes, los cuales a su vez pueden afectar la energía requerida (energía activación) para la liberación del hidrógeno.

b). Concentración de los reactivos y productos de la reacción. En ocasiones la concentración de alguno de los intermediarios puede imponerse a cualquiera de los otros factores mencionados y marcar la ruta del mecanismo.

Considerando los factores anteriores, las propiedades moleculares que pueden contribuir a esclarecer la secuencia de desprotonación y por consiguiente el mecanismo antioxidante de los flavonoides son: termoquímicas que describen el proceso energético, así como eléctricas, magnéticas y de reactividad que revelan los efectos polares.

Para determinar los efectos polares de los sustituyentes en las disociaciones de enlaces, la técnica cinética más recomendada es la fotoacústica [suryan, et al., 1989]. No obstante, para este caso, la espectroscopia de RMN representa una mejor alternativa debido a que constituye la única técnica experimental capaz de determinar al mismo tiempo los efectos polares y los pK microscópicos de compuestos polifenólicos, permitiendo contribuir de una manera aún más confiable, en el esclarecimiento la secuencia de desprotonación de los flavonoides. Algunos estudios de RMN realizados en (+)-catequina, han mostrado controversias en la secuencia de desprotonación, como consecuencia del empleo de diferentes conformaciones moleculares (anti y syn), así como diferente pH, a lo cual es muy susceptible este tipo de análisis [Slabbert, 1977; y Cren, et al., 2002b].

Es importante señalar, que en las determinaciones experimentales de espectroscopia de RMN de sólidos donde se requieren muestras de alta pureza, se emplean cantidades mínimas de 200 mg. Para una determinación en cianidina, cuyo mg cuesta \$42.00 dólares, se estaría hablando de una inversión

de \$8,400.00 dólares con un equivalente en pesos cercano a \$90,000.00, destinados únicamente a la adquisición de muestra. Análogamente para determinaciones termoquímicas de BDE e IP, existen un gran número de métodos, pero los más utilizados son los calorimétricos, donde se requieren desde 50 mg hasta 1 g de muestra para llevarlas a cabo.

Aparte del costo que pueden implicar los estudios experimentales, el empleo de diferentes métodos que exigen distintas condiciones en el tratamiento de la muestra, dan como resultado una gran variabilidad de los datos que no permite avanzar en esta área de la investigación.

Por las razones comentadas anteriormente, la investigación experimental se ha visto afectada y ha sido necesario recurrir al empleo de métodos alternativos para el estudio de las propiedades intrínsecas de los flavonoides, donde la química computacional ha brindado esta posibilidad. El rápido avance en programas computacionales que aplican la mecánica cuántica en la determinación de propiedades, basados en la estructura química de los compuestos, permite obtener datos confiables a costos bajos, evitando ciertos problemas experimentales de pureza y solubilidad. El gran reto con el que se enfrentan estos métodos, es la reproducibilidad y precisión con la que puedan trabajar en relación a las metodologías experimentales, para ser considerados confiables.

Las limitantes que se han encontrado en los estudios de química computacional realizados hasta el momento, es que no se están empleando los modelos más adecuados para las características de los flavonoides. El método computacional que permite el mejor equilibrio entre tiempo, costo y precisión para el análisis de compuestos aromáticos de tamaño mediano como los flavonoides es la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT). Esta metodología no contempla el factor concentración, pero permite simular técnicas sofisticadas y caras para establecer la secuencia de desprotonación, como la RMN y la calorimetría mediante las estimaciones respectivas de constantes de apantallamiento y cantidades termoquímicas a través de la simulación de reacciones.

El factor clave en DFT que permite cálculos precisos y de bajo costo es la combinación del funcional y conjunto de base empleado. La mejor química modelo con la que cuenta DFT hasta el momento es la conformada por el funcional B3LYP y el conjunto de base 6-311(3df, 2p) [Curtiss y Raghavachari, 1998]; sin embargo, esta no es muy efectiva para moléculas de heterociclos. Tomando en cuenta que el estudio de compuestos heterocíclicos como los flavonoides, son de gran importancia para los seres vivos, se desarrolló en nuestro laboratorio una nueva química modelo especial para sistemas heterocíclicos conocida como CHIH-DFT, la cual es empleada en este estudio para contribuir en el esclarecimiento del mecanismo antioxidante de los flavonoides.

Partiendo de que la secuencia de desprotonación y los compuestos intermediarios que se forman durante la reacción, muestran ser el punto clave en el esclarecimiento del mecanismo antioxidante de los flavonoides, y tomando en cuenta que hasta el momento no existen bases sólidas para establecerlo, se plantea como hipótesis de este estudio la siguiente:

## Hipótesis

La secuencia de desprotonación de los flavonoides es dependiente de la estructura, así como de las propiedades moleculares de los intermediarios que se forman después de la transferencia de los átomos de hidrógeno, y constituye el factor determinante en el mecanismo de reacción seguido por los flavonoides para ejercer su potencial antioxidante.

## Objetivo General

Determinar los sitios reactivos, así como la secuencia de desprotonación en las moléculas de quercetina, (+)-catequina y cianidina, basados en la estructura y propiedades moleculares de sus intermediarios, con la finalidad de contribuir a esclarecer su mecanismo antioxidante, empleando DFT bajo simulación de condiciones fisiológicas.

## Objetivos Particulares

- 1.- Determinar las estructuras optimizadas y propiedades moleculares de quercetina, (+)-catequina y cianidina en su estado neutro, en fases de gas y agua, para conocer si existe variación en su estabilidad y reactividad en diferentes fases.
- 2.- Definir los sitios reactivos de los flavonoides seleccionados en fase acuosa, para determinar los radicales fenoxilo, radicales catión y aniones fenóxido que se pueden formar como interemediarios al simular condiciones fisiológicas.
- 3.- Calcular las optimizaciones, así como las propiedades termoquímicas y magnéticas de cada uno de los radicales fenoxilo (semiquinonas), radicales catión y aniones fenóxido en fase acuosa.
- 4.- Determinar la estabilidad de cada una de las quinonas formadas.
- 5.- Establecer la secuencia de desprotonación de quercetina, (+)-catequina y cianidina en fase acuosa.

## ANTECEDENTES

### Flavonoides

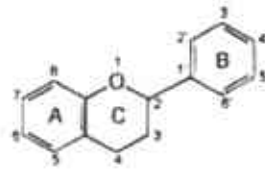
#### **Estructura Química**

Son compuestos hidroxiaromáticos naturales, cuya estructura básica es el núcleo flavan, que consiste de 15 carbonos arreglados en tres anillos difenilpropanos ( $C_6C_3C_6$ ) denominados anillos A, C y B respectivamente. Estos son derivados de la ruta del ácido shiquímico y del acetato [Pietta, 2000; y Pérez, 2003]. El ácido shiquímico surge de la combinación del fosfoenolpiruvato (PEP) proveniente de la ruta glicolítica de la respiración y el 4-fosfato de eritrosa de la ruta respiratoria de las pentosas fosfato [Salisbury y Ross, 1994]. A partir del ácido shiquímico derivan aminoácidos aromáticos como fenilalanina tirosina y triptófano, de los cuales se forman el ácido cinámico y el ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato originan la estructura de los flavonoides [Wagner y Farkas, 1975]. Los anillos A y B son fenilos que se unen a través de un anillo C de pirano, el cual contiene en su estructura un heteroátomo de oxígeno [Kuhnau, 1976]. El anillo A y el oxígeno del anillo C, derivan por completo de unidades de acetato proporcionadas por el acetyl CoA, mientras que el anillo B y la unidad de pirano que constituye al anillo C, se sintetizan a partir de la ruta del ácido shiquímico [Salisbury y Ross, 1994].

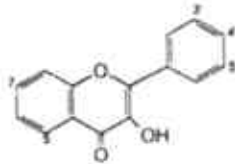
En base a los grupos funcionales que los constituyen se clasifican de acuerdo a Pietta, 2000, de la siguiente manera:

- 1) 4-oxo- flavonoides
  - Flavonas: luteolina, apigenina, crisina.
  - Flavonoles: quercetina, kaempferol, galangina, fisetina y mirecetina.
  - Flavanonas: hespertina y naringenina.
  - Flavononoles: taxifolina.
- 2) Sales de flavilium: antocianidinas (cianidina, pelargonidina, delfinidina, peonidina, malvidina), antocianinas (cianina).
- 3) Isoflavonas: genisteina, genistina, daidzeina, daidzina, biocanina A.
- 4) Derivados flavan 3-ol: catequinas, epicatequinas, epigalocatequinas y taninos.

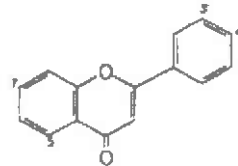
En el Esquema 1, se muestra la estructura general de los flavonoides y las estructuras de las clases principales de ellos. La estructura general indica que los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6' [Kuhnau, 1976]. Las estructuras de las clases principales, muestran unos números, donde cada uno de ellos indica la posición de los grupos hidroxilos presentes en la molécula [Pietta, 2000].



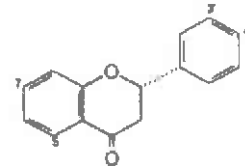
Estructura básica de un flavonoide



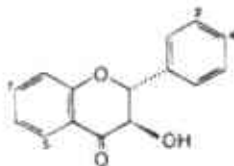
Flavonol



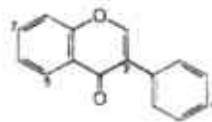
Flavona



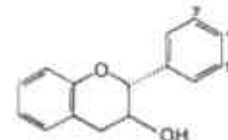
Flavanona



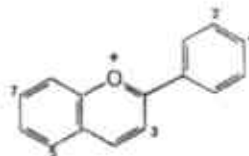
Flavanonol



Isoflavona



Flavan-3-ol



Sales de flavillium

Esquema 1. Estructura química de los flavonoides

La molécula de quercetina (3, 5,7,3',4'-pentahidroxi flavona) perteneciente al grupo de los flavonoles, posee en el anillo B dos grupos hidroxilos en las posiciones C3' y C4', que forman el grupo catecol. En el anillo C presenta un doble enlace entre C2 y C3, así como también un grupo hidroxilo en C3 y el grupo oxo en C4. En el anillo A presenta dos grupos hidroxilos en C5 y C7 que dan lugar a la formación del grupo resorcinol. De acuerdo a Bors, et al., 1990, la presencia en conjunto de estos grupos funcionales, son los que mejores propiedades antioxidantes imparten a los flavonoides.

A quercetina se le puede encontrar en forma de aglicón, cuya representación corresponde a la estructura mostrada anteriormente, y en forma glicosilada. El azúcar predominante involucrado en la glicosilación de los flavonoides de manzana es galactosa, seguido por glucosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; en otros frutos es común encontrar el ácido glucurónico, ya que el patrón de glicosilación varía con el tejido vegetal y el tipo de flavonoide. En



quercetina presente en la piel de manzana el orden de glicosilación es ligeramente alterado a galactosa, glucosa, xilosa, arabinosa y ramnosa. Al igual que el resto de los flavonoides su sitio preferencial de glicosilación es el 3-OH, y la forma glicosilada más común de quercetina se conoce como rutina [Scalbert y Williamson, 2000; y Tsao, et al., 2003].

Otro aspecto importante de la estructura química de quercetina, es que no constituye un sustrato para la enzima polifenoloxidasas, la cual es también abundante en manzana y en un gran número de tejidos vegetales, por esta razón no pierde su actividad antioxidante. Esto es sumamente importante, ya que esta enzima actúa en condiciones en fresco cuando los frutos son partidos o se les elimina la piel [van der Sluis, et al., 2001].

La molécula de (+)-catequina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavan) representativa del grupo de los flavan-3-ol, también posee el grupo catecol del anillo B. A diferencia de quercetina carece del doble enlace y del grupo ceto del anillo C, pero presenta el grupo 3-OH. También posee el grupo resorcinol del anillo A. Debido a la carencia del doble enlace C2-C3, esta molécula puede presentar isomerismo cis-trans, epimerizaciones y racemización [Seeram y Nair, 2002]. Los flavanoles como (+)-catequina existen en forma de aglicón, no se glicosilan, pero si se polimerizan de manera natural para formar taninos [Scalbert y Williamson, 2000].

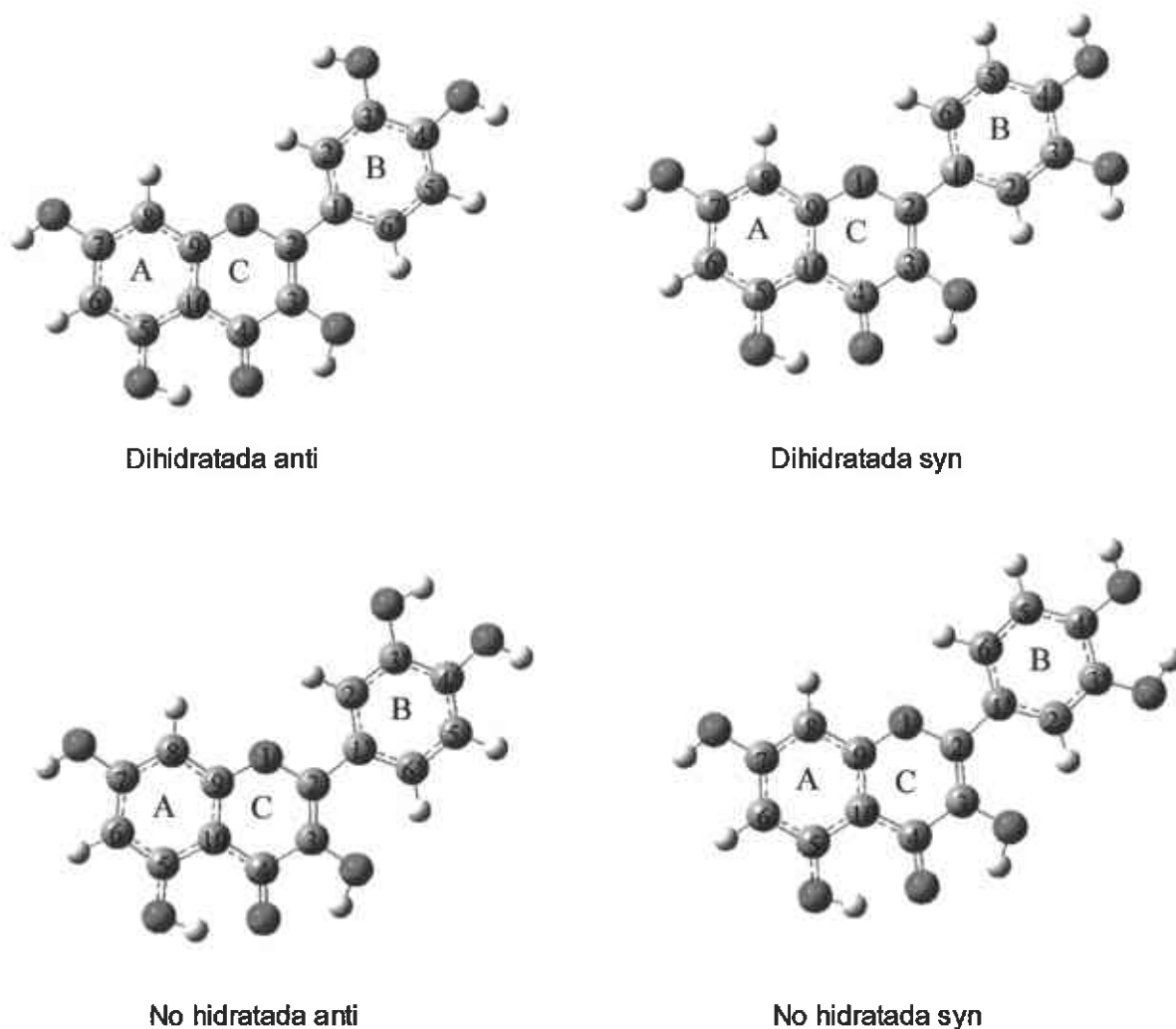
La capacidad que tiene (+)-catequina para polimerizarse, le ha dado aplicación como copolímero de poliésteres en la elaboración de polímeros biodegradables que son de gran utilidad en la industria y área biomédica, donde son empleados en la fabricación de vendas para heridas e implantes quirúrgicos. La copolimerización se establece entre los grupos carbonilo del poliéster con los hidroxilos de (+)-catequina, mediante puentes de hidrógeno que son responsables de la fuerza y extensibilidad del polímero, así como de que puedan ser degradados biológicamente, lo cual incrementa su uso, dado el impacto ecológico generado [Zhu, et al., 2003 y Zhu, et al., 2004].

El flavonoide cianidina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavillium) perteneciente al grupo de las sales de flavillium, también se caracteriza por el grupo catecol, el grupo resorcinol y el grupo 3-OH; sin embargo, carece del grupo ceto y el doble enlace lo presenta entre C3 y C4 del anillo C. Cianidina existe en forma de aglicón, aunque predominantemente se le encuentra glicosilada con galactosa en forma monomérica u oligomérica (4 a 11 unidades). La estructura glicosilada más común recibe el nombre de cianina y los sitios principales de sustitución glicosídica son el 3-OH y 5-OH [Scalbert y Williamson, 2000]. Aunque el 3-galactósido es el más común de los glicósidos en piel de manzana, el 3-glucósido es el más activo antioxidante de las antocianinas [Wang, et al., 1997].

Por su estructura, las sales de flavillium son pigmentos responsables de los atractivos colores rojos, azules y púrpuras en frutos, jugos de frutos, vinos, flores y vegetales [Seeram y Nair, 2002]. Debido a la restricción en el uso de colorantes artificiales, tanto en materiales como en la industria de los alimentos, mucha investigación se ha realizado en relación a los mecanismos de degradación de antocianinas y antocianidinas [Timberlake y Bridle, 1965].

**Conformaciones.** Como se comentó anteriormente, en la fase sólida, quercetina, (+)-catequina y cianidina pueden existir como cristales hidratados y anhidros con dos conformaciones: anti y syn [Yin, et al., 1990; y Olejniczak y Potrzebowski, 2004]. Las conformaciones anti y syn están definidas en base a las orientaciones de los grupos hidroxilos de los carbonos 3 y 3' de los anillos C y B respectivamente. En la conformación anti los grupos hidroxilos de ambos carbonos se disponen en posición contraria, mientras en la conformación syn es hacia el mismo lado por inversión (rotación de 180°) del anillo B. Para ilustrar estas conformaciones se tomaron como ejemplo las estructuras anti y syn de las moléculas dihidratadas y no hidratadas de quercetina, las cuales fueron demostradas por Olejniczak y Potrzebowski, 2004, y se pueden visualizar en el Esquema 2. Dichas conformaciones pueden presentarse de igual manera en (+)-catequina y cianidina.

La conformación más estable de los flavonoides, la cual ha sido aislada del plasma humano es la no hidratada en la posición anti. La conformación dihidratada es exclusiva del estado sólido.



Esquema 2

## **Solubilidad**

El hecho de ser compuestos hidroxiaromáticos, confiere a los flavonoides una estructura anfipática que les permite interactuar con la fase acuosa y también en la interfase orgánica de las membranas. Si bien esta es una propiedad que les ofrece ventajas en relación a otros sistemas antioxidantes como las vitaminas C y E, también les produce desventajas desde el punto de vista de solubilidad, por resultar parcialmente solubles en agua y en solventes orgánicos. Entre los solventes en que suelen ser más solubles se encuentran cloroformo y metanol, los cuales se pueden utilizar mezclados con el agua para incrementar levemente la polaridad y lograr una mejor disolución [Burda y Oleszek, 2001 y van der Sluis, et al., 2001].

La heterogeneidad en las estructuras de los flavonoides, generada por la diversidad en el número y tipo de grupos sustituyentes, también representa un problema para la solubilidad. En un estudio donde se midió la actividad antioxidante a diferentes grupos de flavonoides, entre ellos flavonoles, flavonas y flavanonas, se utilizó una mezcla de cloroformo y agua, observándose diferencias en las solubilidades de dichos compuestos. Aunque se efectuó una prueba de correlación entre los coeficientes de partición dados por la mezcla de solventes y la actividad antioxidante, sin encontrarse diferencia estadística, es relevante mencionar que en ciertos estudios enfocados a medir actividad biológica, los parámetros estadísticos suelen ser de menor peso que el significado biológico observado [Burda y Oleszek, 2001].

En otros estudios se ha encontrado que el uso de solventes con los que se logra una mejor disolución de los flavonoides, como por ejemplo el ácido acético, se inducen cambios de oxidación, por lo que para este tipo de pruebas no es recomendable su utilización [van der Sluis, et al., 2001]. El empleo de etanol y sulfóxido de dimetilo (DMSO) han mostrado ser muy efectivos en la disolución de los flavonoides, y no inducen cambios de oxidación; sin embargo, ambos solventes presentan por sí mismos una buena actividad para inhibir radicales, por lo que su uso interferiría con pruebas en este sentido [Van Acker, et al., 1996a].

La estructura glicosilada de los flavonoides es soluble en agua, mientras que la estructura de aglicón tiende a ser más soluble en solventes orgánicos. Quizá sea esta la razón por la cual las formas glicosiladas abundan en los tejidos vegetales y los aglicones son minoritarios. Mientras que en los seres humanos, para ser absorbidos en el tracto gastrointestinal y pasar el plasma, requieren ser deglicósilados.

La purificación de los glicósidos de flavonoides a partir de extractos vegetales acuosos, es difícil debido al gran número de compuestos como vitaminas, carbohidratos y proteínas que son polarmente compatibles con ellos y se solubilizan en agua [Degenhardt, et al., 2000; y Einbond et al., 2004]. Por esta razón la adquisición de muestras de flavonoides con alto grado de pureza resulta caro, sobretodo en forma de aglicón, ya que en este caso, se requieren etapas extras para la eliminación de los residuos de azúcares de las moléculas y para obtener la conformación de cristal deseada (hidratada, no hidratada).

Desde el punto de vista de actividad antioxidante, la solubilidad de estas formas de flavonoides es importante, debido a que la estructura de aglicón es la que ofrece mejores propiedades antioxidantes que los respectivos glicósidos.

El pH es otro factor de relevancia en la solubilidad de los flavonoides, sobretodo en su forma de aglicón, por razón de que la mayoría de ellos son poco solubles en soluciones acuosas neutras, pero resultan solubles en soluciones acuosas alcalinas. De esta manera, las estructuras de equilibrio (neutras o ionizadas) que predominan en una solución son totalmente dependientes del pH [Jovanovic, et al., 1994].

### **Actividad Antioxidante**

Las reacciones de oxidación-reducción constituyen una parte esencial del metabolismo aeróbico en los organismos vivos y ocurren principalmente entre moléculas orgánicas, mediadas por enzimas [Lehninger, et al., 1995].

Es común que durante el desarrollo de procesos biológicos normales, basados en reacciones de oxidación-reducción, como la producción de energía, fagocitosis, regulación del crecimiento celular, señalización intercelular y síntesis de compuestos biológicos importantes como el ATP, se dé la formación (a manera de intermediarios) de especies de oxígeno reactivas (ROS) que no tienen acción como radicales libres, entre ellos: oxígeno ( $O_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido hipocloroso (HClO) [Lehninger, et al., 1995; Davies, 1995; y Halliwell, 1997]. Sin embargo, el organismo puede sufrir desequilibrios que conducen a la formación de ROS que sí tienen actividad como radicales libres por la transferencia de electrones desapareados, y atacan a los lípidos constituyentes de las membranas celulares, modifican proteínas estructurales de los tejidos o con actividad enzimática, así como carbohidratos y DNA. Por estas razones la producción de ROS con actividad de radicales libres, se asocia con la aparición de ciertas enfermedades como el cáncer, padecimientos del corazón y HIV) [Davies, 1995 y Erkoc, et al., 2003].

A manera de defensa, los organismos vivos cuentan con un sistema endógeno de antioxidantes que incluyen compuestos de carácter enzimático (Se-glutación, peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) y no enzimático (Glutación, proteínas transferrina y ferritina que ligan hierro) [Warma, et al., 1995]. Adicionalmente el organismo humano cuenta con un sistema de defensa exógeno que refuerza al endógeno y que es adquirido a través de la dieta. Dentro del sistema exógeno se encuentran la vitamina A (carotenos), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles) y polifenoles, entre los cuales los más abundantes (2/3 partes) son los flavonoides. Todos estos compuestos tienen que ser adquiridos por medio de la dieta, debido a que el organismo humano es incapaz de producirlos. Dependiendo de los alimentos consumidos la ingesta de flavonoides varía en un rango promedio de 50-1,100 mg/día, el cual resulta considerablemente alto comparado con aquellos de vitamina C (70-100 mg/día), vitamina E (7-10 mg/día) y carotenoides (2-3 mg/día) [Kuhnau, 1976; y Rice-Evans y Packer, 1998].

Los flavonoides han mostrado tener mayor actividad antioxidante que otros sistemas fisiológicos de los organismos vivos, como  $\beta$ -caroteno, vitamina C y vitamina E [Warma, et al., 1995]. Los flavonoles como quercetina, son los antioxidantes naturales que más efectividad han mostrado, ya que mediante pruebas *in vitro* han probado ser hasta 20 veces más potentes que la vitamina C y 5 veces mayor al de vitamina E [Miean y Mohamed, 2001; y Martínez, et al., 2002]. Estas propiedades son atribuidas a su estructura anfipática, debido a que pueden reaccionar a la par con radicales libres hidrosolubles y liposolubles, lo cual les permite atravesar la barrera hematoencefálica y proteger de la oxidación a las células del cerebro. Además pueden interaccionar con antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C y antioxidantes liposolubles como la vitamina E, con lo cual se logran efectos sinérgicos en el potencial antioxidante. Este hecho es importante porque los diferentes tipos de sistemas antioxidantes requieren complementarse unos a otros, debido a que ellos actúan contra diferentes especies radicales y en diferentes compartimentos celulares [Pietta, 2000; y Martínez, et al., 2002].

Un antioxidante es definido como un compuesto que decremента o inhibe la oxidación de biomoléculas [Jadhav, et al., 1996], y debe reunir las siguientes características:

- En primer término, debe proteger a las biomoléculas contra la oxidación, aún cuando se encuentre a bajas concentraciones [Larson, 1997; y Pérez, 2003].

Estudios en humanos han encontrado que los flavonoides aparecen en el plasma sanguíneo, a niveles activos farmacológicamente, después del consumo de ciertos alimentos [Einbond et al., 2004]. Por cada 10-100 mg consumidos de un flavonoide en particular, la máxima concentración que se alcanza en plasma es aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  [Azis, et al., 1998]. En un estudio experimental *in vitro* realizado por Seeram y Nair, 2001, se encontró que los flavonoides (+)-catequina y cianidina, requieren de una concentración de 40  $\mu\text{M}$  para inhibir el 60% de la peroxidación lipídica inducida por iones de Fe(II). Esto implica que con una dieta rica en flavonoides de 1 g/día, se pueden llegar a obtener hasta 100  $\mu\text{M}$  de flavonoides, que permiten cubrir los requerimientos para efectuar su actividad antioxidante a nivel de radicales peróxidos. El grupo de las catequinas han mostrado ser eficientes para reducir la incidencia de cáncer y enfermedades vasculares, a niveles de concentraciones plasmáticas tan bajas como 0.3-0.4  $\mu\text{M}$  [Kondo, et al., 1999]. La efectividad de las catequinas en todas sus formas conjugadas, es aún mayor en la supresión de peroxidación lipídica de tejidos biológicos, fracciones subcelulares, microsomas y LDL, debido a la baja concentración de 91 nmol/L en que ha mostrado su actividad [Donavan, et al., 1999].

- Otra característica importante de todo antioxidante es que el radical o ion formado como intermediario durante la reacción, debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva, ya que un radical o ion altamente reactivo podría propagar reacciones en cadena en perjuicio de las biomoléculas [Pérez, 2003].

- La función de los antioxidantes es interceptar y reaccionar con los oxidantes (enzimas, metales y radicales libres) a una tasa más rápida que las biomoléculas que constituyen el sustrato (lípidos, grasas, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos) [Wright et al., 2001].

Cuando un antioxidante se añade a los alimentos, adicionalmente debe contribuir a minimizar la rancidez, retardar la formación de productos de oxidación tóxicos, mantener la calidad nutricional e incrementar su vida de anaquel [Jadhav, et al., 1996].

La actividad antioxidante consiste en una transición redox, a través de la cual la molécula antioxidante libera un átomo de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre, y/o permite la formación de ligandos que facilitan la quelación de metales y la interacción con enzimas.

Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que los flavonoides ejercen su actividad antioxidante, actuando en las diferentes etapas del ciclo de formación de radicales libres. Pueden inhibir enzimas y quelar metales, atrapar a los radicales libres formados y regular defensas antioxidantes formadas en el organismo humano. Cada una de estas etapas se describen a continuación:

1. Durante las etapas iniciales del ciclo, los flavonoides inhiben la formación de radicales libres por inactivación de enzimas, o la quelación de elementos traza como Fe y Cu, que intervienen catalizando la reacción [van Acker, et al., 1996b y Pietta, 2000].

Ejemplos de enzimas inhibidas: Prostaglandina sintetasa, ciclooxigenasa y lipoxigenasa (relacionadas con tumores cancerosos), además de xantina oxidasa, proteína quinasa C, monooxigenasa microsomal, glutathion S-transferasa, succinoxidasa mitocondrial, y NADH-oxidasa.

El exceso de hierro y cobre libres pueden producir efectos dañinos al reducir el peróxido de hidrógeno que se forma como intermediario en el metabolismo normal, generando así radicales libres altamente reactivos, como se muestra en la siguiente reacción establecida en el mecanismo de Fenton:



Los flavonoides tienen la capacidad para interceptar o quelar los metales de transición como el Fe y Cu libres, formando un complejo que evita la reacción anterior. Se ha demostrado que la quelación de metales de transición, por parte de los flavonoides, ocurre con un mínimo de un ligando desprotonado, y la capacidad antioxidante se incrementa con el número de ligandos disponibles para secuestrar metales [Hotta, et al., 2001].

Los flavonoides con mayor capacidad antioxidante (quercetina) son reportados para ser más efectivos en la inhibición de iones de Fe(III)/Fe(II), y los que tienen un potencial redox mas bajo (catequina), han mostrado ser mas efectivos en la quelación de Cu (II)/Cu (I) [Fernandez, et al., 2002]. Alguna evidencia ha sugerido, que los flavonoides también tienen capacidad quelante

en otros metales que no son de transición y que causan oxidación [Arora, et al., 1998; y Ross y Kasum, 2002].

2. En etapas mas avanzadas del ciclo, los flavonoides actúan bloqueando los radicales libres que ya se formaron [Pietta, 2000].

Para la inhibición de los radicales libres ya formados se han planteado tres posibles mecanismos, por medio de los cuales los flavonoides ejercen su actividad antioxidante:

- I. Donación de un átomo de hidrógeno, que implica la transferencia simultánea de un electrón y un protón desde la molécula del flavonoide hacia el radical libre, que da lugar a la formación de un radical fenoxilo o semiquinona y se representa mediante la siguiente reacción:



La transferencia directa de un átomo de hidrógeno al radical libre representa una ruptura homolítica de los enlaces O-H y C-H.

- II. Transferencia de un electrón de la molécula del flavonoide al radical libre, formándose un radical catión y es ilustrada por la siguiente reacción:



- III. Donación de un protón de la molécula del flavonoide al radical libre, que resulta en la formación de un anión fenóxido y la reacción es la siguiente:



La transferencia por etapas secuenciales de un electrón y un protón representa una ruptura heterolítica de los enlaces O-H y C-H.

Los dos primeros, constituyen los principales mecanismos efectuados por los flavonoides [Leopoldini, et al., 2004; y Trouillas, et al., 2006].

Regularmente, las pruebas experimentales *in vitro* que se utilizan para determinar la actividad antioxidante que tienen los flavonoides, basada en la inhibición de radicales libres ya formados, se efectúan a través de compuestos cuyas propiedades termoquímicas ya han sido bien establecidas, como por ejemplo 2,2-difenil-1-picrylhidrazyl (DPPH) y tert-butoxilo (*t*-BuO) [Wayner, et al., 1995; Kahkonen y Heinonen, 2003].

3. Adicionalmente, los flavonoides contribuyen a la sobrerregulación o protección de las defensas antioxidantes ya existentes en los organismos vivos [Pietta, 2000].

A este respecto se ha encontrado que el flavonoide quercetina ayuda a incrementar hasta en un 50% los niveles intracelulares de glutatión (antioxidante endógeno) actuando a nivel de gen regulador [Martínez, et al., 2002]. También actúa a nivel enzimático regulando la glutatión-S transferasa, la cual tiene efecto para inhibir radicales libres peróxidos y detoxificar microorganismos xenobióticos con potencial mutagénico, realizando una acción protectora contra el cáncer [Dirven, et al., 1995].

El mecanismo de transferencia del o de los átomos de hidrógeno seguido por el antioxidante, así como la etapa del ciclo redox en la que actúa son totalmente dependientes de su estructura química y las condiciones del medio donde se lleva a cabo la reacción.

Varios estudios efectuados *in vivo*, apoyan los efectos antioxidantes protectivos del consumo de frutos y vegetales frescos contra el cáncer y enfermedades cardíacas [Ingram, et al., 1997 y Frei, 1995], por efecto de una correlación inversa entre el consumo de flavonoides y dichas enfermedades. Sin embargo, estos logros se han alcanzado principalmente en tejido *ex vivo* y animales, ya que la evidencia en humanos aún es muy limitada [Hertog, 1996 y Wang y Goodman, 1999].

Efectos del pH en la actividad antioxidante. De acuerdo a Martínez, et al., (2002), las propiedades ácido-base de algunos flavonoides, muestran que los radicales fenoxilo son neutros en un medio ácido, por debajo de pH 3, y adquieren carga negativa a pH 7. Esto quiere decir que al pH fisiológico de los tejidos vegetales (5.0-7.5) y plasma humano (7.4), la forma más probable de encontrar a dichos flavonoides es como anión fenóxido. Tal es el caso de quercetina, ya que se ha demostrado que su grupo catecol se desprotona totalmente en dos etapas secuenciales a pH fisiológico, lo que implica que dentro del organismo humano puede ejercer una alta actividad antioxidante [Van Acker, et al., 1996a]. No obstante, estas propiedades ácido-base no son aplicables a todos los flavonoides, ya que dichas propiedades varían con la estructura.

En un estudio enfocado a determinar las constantes de disociación de varios fenoles, se encontró que a pH 7 la molécula de catequina permanece neutra, mientras que a pH 10 adquiere doble carga negativa [Jovanovic, et al., 1994].

Las sales de flavillium que incluye antocianidinas y antocianinas, existen como diferentes entidades químicas o tautómeros [Rastelli, et al., 1993]. Dependiendo del pH las sales de flavillium pueden existir en cinco diferentes formas de equilibrio: catión flavillium, carbinol, pseudobase, calcona, base quinoidal y anión quinoidal [Matsumoto, et al., 2002].

El catión flavillium es dominante a pH muy ácido entre 1-3. En medio acuoso a medida que el pH se incrementa de 4-5, las reacciones de hidratación generan carbinol y pseudo-base, los cuales pueden experimentar apertura del anillo para dar calconas amarillas. El catión de flavillium puede ser alternativamente transformado a bases quinoidales a través de reacciones de transferencia de protones y a un pH entre 6-7 puede convertirse en aniones



quinoides azul-púrpura. A pH fisiológico (7.4), el equilibrio de las formas dependientes del pH de antocianidinas y antocianinas pueden convertirse desde su forma de catión a favor de formas quinoides [Kahkonen y Heinonen, 2003].

La estabilidad de las antocianidinas y antocianinas son fuertemente afectadas por el pH y la solubilidad, de tal manera, que las condiciones usadas en los diferentes ensayos pueden alterar la estabilidad de sus compuestos, y por lo tanto, su actividad antioxidante [Fukumoto y Mazza, 2000].

### **Actividad Prooxidante**

Una de las limitantes que frenan el uso potencial de los flavonoides, sobre todo en la industria alimentaria y farmacológica es su actividad prooxidante. Tales efectos son contrarios a la actividad antioxidante y se dan como resultado de la formación de un radical o ión aroxilo lábil, así como también por la formación de un complejo flavonoide hierro redox lábil o una quinona poco estable. La autooxidación de un radical aroxilo genera un anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el cual mediante la secuencia conocida como reacciones de Fenton y Haber-Weiss, genera el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), posteriormente se forman los hidroperóxidos (LOOH). Esta serie de reacciones conllevan a la formación de radicales alcóxilo ( $LO^{\cdot}$ ), los cuales al propagarse en forma cíclica se manifiestan como efectos citotóxicos y mutagénicos [Svingen, et al., 1979].

Hodnick, et al., (1988), afirman que para el desarrollo de las reacciones de Fenton, se requieren altas concentraciones del flavonoide y de metales como el Fe y Cu, debido a que esas condiciones son necesarias para que se forme el radical hidroxilo. Sin embargo, Fukumoto y Mazza, 2000, mediante un estudio experimental *in vitro*, han determinado que para flavonoides como quercetina, (+)-catequina y cianidina, la actividad prooxidante se puede presentar a bajas concentraciones, con cantidades aproximadas a las 100  $\mu M$  de cada uno de estos compuestos se inicia su actividad prooxidante.

Durante la transferencia de un átomo de hidrógeno se forma un radical fenóxilo o semiquinona, y mediante la transferencia de dos átomos de hidrógeno se da lugar a la formación de una quinona. Cuando una quinona es inestable, puede actuar como aceptor de Michael, reaccionando con nucleófilos como proteínas y DNA, a partir de las cuales forma derivados alquilo que son reactivos. Además puede actuar sobre el glutatión, conduciendo a cambios en el potencial redox celular con consecuencias negativas. En el caso que la energía necesaria para donar el segundo átomo de hidrógeno sea lo suficientemente menor que la energía requerida para donar el primero, se establece un ciclo redox de quinona-semiquinona, en el cual al participar el oxígeno es reducido a ion superóxido, iniciándose una reacción cíclica prooxidante que conlleva a la generación de radicales libres [Bolton, et al., 2000; y Hussain, et al., 2003].

La mutagenicidad, y por lo tanto la actividad prooxidante, también pueden provenir a través de enzimas bacterianas, ya que se demostró que la hidrólisis de los glucósidos de flavonoides por medio de bacterias intestinales puede conducir a la formación de aglicones potencialmente mutagénicos.

El estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales ocurren los procesos benéficos y adversos de los flavonoides no ha podido ser esclarecido, ya que no se cuentan con las bases moleculares adecuadas que permitan establecer la relación de su estructura y propiedades.

Por lo planteado anteriormente se establece que la actividad antioxidante y prooxidante de los flavonoides es totalmente dependiente de su estructura y obedece los siguientes factores:

- La facilidad para donar uno o más átomos de hidrógeno o electrones.
- La estabilidad del ión, semiquinona o quinona (intermediarios formados).
- La concentración final que se alcance del flavonoide y su respectivo ión, semiquinona o quinona formados en el sitio donde los radicales libres son producidos.
- La polaridad para ser captado por la membrana, fragmento de DNA, proteína, carbohidrato, residuo aminoacídico o elemento traza donde va a actuar.
- pH del medio donde se lleva a cabo la reacción.

### Química Computacional

La química computacional es una disciplina orientada al desarrollo y al entendimiento de la química, basada en la explotación de las potencialidades de métodos y técnicas computacionales. Los métodos empleados por la química computacional se crean a partir de la combinación de principios matemáticos con las leyes fundamentales de la física, dando lugar a procesos que adaptados al lenguaje y a la rapidez de una computadora (programas computacionales), permiten efectuar cálculos con la finalidad de dar solución a problemas químicos específicos en un lapso de tiempo breve para algunos casos. La relevancia de esta rama de la ciencia es doble, por una parte permite la posibilidad de probar suposiciones teóricas basadas en contextos realísticos, y por otra parte, brinda la posibilidad de imitar o simular completamente sistemas complejos existentes. Esto hace relevante a la química computacional en el progreso de casi toda la ciencia y disciplinas de la ingeniería [Riagnelli y Faginas, 2002].

Los modelos y métodos computacionales desarrollados hasta el momento abarcan dos áreas: Mecánica molecular y Mecánica cuántica. La mecánica molecular tiene como base las leyes de la física clásica para predecir la estructura y propiedades de las moléculas. Sin embargo los métodos fundamentados en ella presentan la gran desventaja de no tratar el comportamiento electrónico [Foresman y Frisch, 1996].

La descripción detallada de la distribución y comportamiento de los electrones en las moléculas no puede ser descrita correctamente por la mecánica clásica. La estructura de las moléculas y sus propiedades se comprenden mejor mediante la mecánica cuántica, ya que describe a las moléculas en términos de interacciones entre núcleo y electrones, y la

geometría molecular en términos de energía mínima en el rearrreglo de los núcleos. Los métodos basados en la mecánica cuántica se conocen como métodos de estructura electrónica, entre los que se encuentran los Semiempíricos, ab Initio y Teoría de funcionales de la densidad (DFT) [Parr, et al., 1999].

Para lograr un mejor entendimiento de la forma en que operan los métodos computacionales, especialmente los de estructura electrónica, resulta indispensable definir previamente algunos conceptos químicos, físicos y matemáticos básicos.

## Conceptos y Fundamentos Básicos

### Ecuación de Onda de Schrödinger.

La representación general de la ecuación de onda es la siguiente:

$$\hat{H} \Psi = E \Psi \quad (1)$$

Donde  $\hat{H}$  es el operador Hamiltoniano,  $\Psi$  una función de onda y  $E$  la energía electrónica.

La energía juega un papel privilegiado en los postulados de la mecánica cuántica y su operador asociado es el Hamiltoniano ( $\hat{H}$ ). La ecuación resultante del primer postulado de la mecánica cuántica, se conoce como ecuación de Schrödinger no relativista independiente del tiempo, y es la que se representa en la ecuación (2), donde  $\hat{H}$  está dado por:

$$\hat{H} = - \sum_i^{\text{partículas}} \frac{\nabla_i^2}{2m_i} + \sum_{i < j}^{\text{partículas}} \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2)$$

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2}$$

El primer término representa la energía cinética y está dado por la suma del operador Laplaciano ( $\nabla_i^2$ ) sobre todas las partículas en la molécula (núcleos y electrones). El segundo término representa la energía potencial debida a la atracción o repulsión de las partículas. Los símbolos  $m_i$  y  $q_i$ , son la masa y la carga de la partícula  $i$ , y  $r_{ij}$  es la distancia entre partículas [Young, 2001].

De acuerdo al segundo postulado de la ecuación de onda, lo que tiene significado físico no es la función de onda en sí misma sino el cuadrado del módulo, ya que para un determinado valor de las variables será un número real. En otras palabras, esto quiere decir que lo que tiene significado es el cuadrado de la amplitud ( $\phi^2$ ). Para ondas de electrones,  $\phi^2$ , representa la probabilidad de encontrar un electrón en un determinado lugar de la región orbital [Morrison Boyd, 1998; y Bertran, et al., 2001].

La interpretación anteriormente dada de la función de onda impone restricciones sobre la misma: El cuadrado del módulo debe ser adiccionario para que se pueda normalizar. La función normalizada es la que permite obtención de probabilidades, dado que la probabilidad de encontrar la partícula en todo el espacio es igual a uno. Si la función tomara valores hasta infinito, no se podría normalizar y no se le daría la interpretación probabilística. Toda ecuación de onda tiene un conjunto de soluciones, de hecho infinitas, cada una de las cuales corresponde a un nivel energético diferente. Por consiguiente resulta que los cuantos de energía son una consecuencia natural de las matemáticas [Young, 2001].

Aproximaciones empleadas para solucionar la ecuación de onda. La solución de la ecuación de Schrödinger a nivel computacional se basa en aproximaciones, ya que no puede ser resulta exactamente para sistemas moleculares con mas de un electrón. Además, necesitan ser introducidas para reducir las operaciones y crear métodos prácticos. Una de las primeras aproximaciones que utilizan los paquetes computacionales para simplificar la ecuación de onda es conocida como:

**Aproximación de Born-Oppenheimer:** Partiendo de que la masa del núcleo es miles de veces más grande que la del electrón, el primero se mueve mucho más lento, mientras que los electrones reaccionan instantáneamente a los cambios en posición nuclear. Por lo tanto, la distribución de electrones dentro de un sistema molecular depende de las posiciones del núcleo y no de sus velocidades, entonces “el movimiento de los electrones puede ser descrito en un campo de núcleo fijo” [Foresman y Frisch, 1996].

En base a esta aproximación, la energía cinética del núcleo se desprecia, y el Hamiltoniano de un sistema molecular así considerado, se modifica de acuerdo a Jensen, 1999, de la siguiente manera:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{nn} \quad (3)$$

Donde se tienen Hamiltonianos correspondientes a:

$\hat{T}_e$  = Energía cinética de los electrones

$\hat{V}_{ne}$  = Energía potencial por atracción núcleo-electrón.

$\hat{V}_{ee}$  = Energía potencial por repulsión entre electrones.

$\hat{V}_{nn}$  = Energía potencial por repulsión entre núcleos.

Otras aproximaciones en las que se basan la mayoría de los métodos y programas computacionales para dar solución a la ecuación de onda, son la teoría de los orbitales moleculares, el principio variacional y los conjuntos de base [Foresman y Frisch, 1996].

**Teoría de Orbitales Moleculares.** Para representar en un programa computacional un orbital molecular, se efectúa una combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA), de una manera muy semejante a como se haría con el procedimiento mecanicocuántico más riguroso. Es parte del mismo enfoque, ya que supone que las formas y direcciones de los orbitales moleculares guardan una relación simple con las formas y direcciones de los orbitales atómicos que intervienen en el enlace, como lo muestran las siguientes ecuaciones [Foresman y Frisch 1996].

$$\psi = \phi_A + \phi_B \quad (4)$$

$\psi$  = orbital molecular  
 $\phi_A$  = orbital atómico A  
 $\phi_B$  = orbital atómico B

La descripción matemática de la CLOA, para la construcción del orbital molecular, es la siguiente:

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^n c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (5)$$

El orbital molecular  $\psi_i$ , se puede expresar como una combinación lineal de un conjunto de  $n$  funciones de base ( $\phi_{\mu}$ ), las cuales tienen un coeficiente de combinación lineal  $C_{\mu i}$  [Ahlrichs y Taylor, 1981; Feller y Davidson, 1986; y Feller y Davidson, 1990].

En base a la fórmula anterior y aplicando el segundo postulado de la mecánica cuántica, la densidad electrónica en una región del espacio está dada por el cuadrado de la amplitud:

$$\psi^* \psi = (\phi_A + \phi_B)^2 = (\phi_A)^2 + (\phi_B)^2 + 2(\phi_A \phi_B) \quad (6)$$

La mecánica cuántica enseña que la combinación lineal de dos funciones no da una sino dos combinaciones posibles, y por lo tanto da dos orbitales moleculares: uno enlazante, más estable que los orbitales atómicos que lo originaron y uno antienlazante, menos estable [Morrison y Boyd, 1998].

En un orbital enlazante, los lóbulos de los orbitales que se unen pertenecen a la misma fase  $+/+$  ó  $-/-$ , lo cual permite el enlace. En el orbital enlazante tipo  $\sigma$ , los electrones se encuentran concentrados en la región entre los núcleos, mientras que en el  $\pi$  se disponen hacia arriba y por debajo de los núcleos. Tales disposiciones favorecen la atracción electrostática entre el núcleo y los electrones, especialmente en los orbitales  $\sigma$ , por lo que disminuye

la energía del sistema y los átomos permanecen unidos [Chang y College, 2002].

En el orbital antienlazante ( $\pi^*$  y  $\sigma^*$ ), los lóbulos de los orbitales que se unen son de fases opuestas (+/-) por lo que se anulan mutuamente, además presentan un plano nodal perpendicular al eje del enlace que pasa entre los núcleos atómicos, el cual impide la atracción electrostática con los electrones ocasionando que la energía del sistema sea muy alta, y como consecuencia no se dé el enlace [Chang y College, 2002].

La combinación lineal deseable matemáticamente, es aquella en la que se forma un orbital molecular enlazante, es decir, en la que los orbitales atómicos se solapan considerablemente, son de energía comparable y tienen la misma simetría en torno al enlace. Cuando se dan estas condiciones hay más probabilidad de encontrar a los electrones en la región de traslape, por lo que resulta importante conocer el grado de solapamiento de los orbitales. Dicho solapamiento se estima a través de la matriz de traslape  $S$ , y es medido como la cantidad de espacio común ocupado por la interacción de los orbitales atómicos [Chang y College, 2002]:

$$S = \int \phi_A^* \phi_B dt \quad (7)$$

La densidad de carga generada en la región de traslape  $S$ , determina la probabilidad de encontrar los electrones en esa región [Jensen, 1999].

Cuando la distribución electrónica en el enlace no es simétrica entre los átomos (por ser diferentes), la CLOA se describe de la siguiente manera:

$$\psi = C_A \phi_A + C_B \phi_B \quad (8)$$

Donde  $C_A$  y  $C_B$  son los coeficientes de expansión correspondientes a cada uno de los orbitales atómicos [Flores, 2002]. La simetría se refiere a que las fases de los lóbulos de los orbitales sean del mismo tipo (+/+ o -/-) para que no se anulen y se puedan traslapar, además de la distribución espacial en relación al plano molecular.

La electronegatividad es uno de los factores que determina la existencia de enlaces no simétricos; usualmente en los orbitales moleculares donde participa un átomo electronegativo su contribución al traslape es mayor [Morrison y Boyd, 1998].

La simetría del enlace también es de gran relevancia en sistemas aromáticos con enlaces deslocalizados. Los orbitales  $\sigma$  son una combinación lineal de orbitales atómicos simétricos, respecto al plano molecular ( $1s$ ,  $2s$ ,  $2p_x$  y  $2p_y$ ), y los orbitales  $\pi$  representan una combinación lineal de orbitales atómicos antisimétricos ( $2p_z$ ) por su ubicación perpendicular al plano molecular. Si se consideran solo los electrones de valencia, los orbitales  $\sigma$  son combinación lineal de los orbitales atómicos  $1s$  del hidrógeno y de los  $2s$ ,  $2p_x$  y  $2p_y$  de los átomos de carbono o heteroátomos como el oxígeno. Por otro lado,

los orbitales  $\pi$  son combinación lineal de los  $2p_z$  de los átomos de carbono o heteroátomos [Bertran, et al., 2000].

Para los cálculos del traslape en los sistemas aromáticos, la separación  $\sigma/\pi$  es rigurosa, ya que las ecuaciones que se construyen al inicio (conocidas como seculares) se anularían si se utilizaran orbitales atómicos de distinta simetría, debido a que no hay interacción directa entre ellos. De esta manera se forman dos bloques. Aunque la separación  $\sigma/\pi$  es totalmente rigurosa y nunca se mezclan orbitales atómicos de distinta simetría, esto no significa que las soluciones de un bloque sean independientes de las soluciones del otro. Contrariamente son dependientes ya que ambos sistemas de electrones aunque no se traslapan, se polarizan mutuamente [Bertran, et al., 2000].

En la molécula de benceno existen seis carbonos, cada uno con tres orbitales híbridos  $sp^2$  y un orbital  $2p_z$ . Con los orbitales híbridos forma tres enlaces  $\sigma$  con dos carbonos adyacentes y un hidrógeno. Esta disposición deja al orbital  $2p_z$  fuera de la hibridación y perpendicular al plano molecular, por esta orientación y forma semejante los seis orbitales  $2p_z$  se traslapan, dando lugar a la formación de tres orbitales  $\pi$  enlazantes con dos electrones cada uno y tres orbitales  $\pi$  antienlazantes vacíos [Chang y Collage, 2002].

Los electrones llenan los orbitales moleculares, siguiendo un orden de energía. Los orbitales que tienden a conservar la simetría respecto al enlace y plano molecular son los de menor energía, y por lo tanto, son los que se llenan primero. El orden usual de energía de los orbitales es el siguiente:  $\sigma$ ,  $\pi$ ,  $\pi^*$  y  $\sigma^*$  [Chang y collage, 2002].

Todos los orbitales moleculares formados mediante la CLOA, son importantes para determinar la estructura de una molécula; sin embargo, desde el punto de vista de reactividad los más importantes son el orbital molecular altamente ocupado por electrones (HOMO) y el orbital molecular bajamente ocupado (LUMO). Usualmente el HOMO corresponde a un orbital tipo  $\pi$  lleno o con pares de electrones sin compartir, mientras que el LUMO corresponde a un orbital vacío tipo  $\pi^*$  o  $\sigma^*$ . El HOMO es un orbital molecular de baja energía respecto al traslape de orbitales atómicos que le dio origen, por ello tiene una alta densidad de electrones; sin embargo, por el número de electrones que posee es considerado un orbital de alta energía electrónica. Contrariamente, el LUMO es un orbital de alta energía respecto al enlace que le dio origen, y es la razón por la que es un orbital vacío y de baja energía electrónica [Chang y collage, 2002].

Las reacciones químicas, especialmente aquellas basadas en la transferencia de electrones, como las de oxidación-reducción, son gobernadas por las interacciones HOMO-LUMO, donde el electrón es transferido desde el HOMO de la molécula donadora al LUMO de la molécula aceptora [Chang y collage, 2002].

**Principio variacional.** Para generar soluciones aproximadas se emplea el principio variacional, el cual establece que cualquier función de onda aproximada produce una energía superior o igual a la energía exacta (Jensen, 1999). Su aplicación consiste en buscar los coeficientes de los orbitales

moleculares, que conlleven al mínimo estado de energía de la molécula, y se verá en métodos de estructura electrónica [Young, 2001].

**Conjuntos de base.** Se definen como un grupo de funciones de base que representan matemáticamente la forma de los orbitales atómicos y confina a los electrones a una región específica del espacio. Son muy útiles, ya que son los que contienen la información para expresar en la computadora, el orden de la combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA) para construir los orbitales moleculares, a partir de los cuales se calculara la energía de una molécula empleando la función de onda [Foresman y Frisch, 1996].

Existen dos tipos de funciones de base que son empleadas para representar los orbitales:

Orbitales tipo Slater (STO) y orbitales tipo Gaussianos (GTO). Su representación matemática es la siguiente:

#### Orbitales tipo Slater (STO)

$$\phi_i(\zeta, n, l, m; r, \theta, \phi) = Nr^{n-1} e^{-\zeta r} Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (9)$$

$N$  = constante de normalización

$\zeta$  = exponente característico STO

$r, \theta, \phi$  = coordenadas esféricas

$Y_{lm}$  = momento angular (función que describe la forma del orbital)

$n, l, m$  = números cuánticos: principal, momento angular y magnético, respectivamente (Jan K. Labanowski).

Representan de manera muy exacta a los orbitales, sin embargo, la presencia del factor exponencial  $r^{n-1}$  dificulta enormemente la resolución de las integrales en sistema electrónicos múltiples, ya que no pueden ser resueltas analíticamente. Por esta razón no son utilizadas [Jensen, 1999; y Bertran, et al., 2000].

#### Orbitales tipo Gaussianos (GTO)

$$g(\zeta, l, m, n; x, y, z) = Ne^{-\zeta r^2} x^l y^m z^n \quad (10)$$

$N$  = constante de normalización

$\zeta r^2$  = exponente característico GTO

$x, y, z$  = coordenadas cartesianas

$n, l, m$  = no son números cuánticos, son simplemente exponentes de integrales de coordenadas cartesianas [Jensen, 1999; y Bertran, et al., 2000].

Por el hecho de no utilizar los números cuánticos y basarse solo en coordenadas cartesianas, así como también el haber eliminado el factor exponencial  $r^{n-1}$  y el haber elevado al cuadrado el factor  $r$  ( $r^2$ ), los orbitales gaussianos, no se consideran realmente orbitales, sino simples funciones



cartesianas [Ahlrichs y Taylor, 1981; Feller y Davidson, 1986; y Feller y Davidson, 1990].

El factor  $r^2$  ocasiona problemas en la representación gráfica de la distribución radial de los electrones (distancia al núcleo). Los electrones cercanos al núcleo no muestran pendientes con elevación adecuada (cusp) y por otra parte, los electrones más alejados del núcleo (electrones de valencia) tampoco son bien representados, ya que la "el límite de la curva asintótica", cae demasiado rápido tocando el eje x. Esto repercute en que la ecuación de onda no se represente adecuadamente, y por lo mismo no se describen correctamente los electrones químicamente más importantes: los de valencia. Esto afecta algunas de las propiedades calculadas como la polarización [Jensen, 1999; y Bertran, et al., 2000].

Con la finalidad de solucionar estos problemas en la representación de las funciones gaussianas, se crearon las funciones contraídas para construir Orbitales Tipo Gaussianos pero con funciones contraídas (CGTO), y se definen como la combinación del conjunto total de funciones de base, conocidas como primitivas (s, p, d, etc.), las cuales se reúnen en pequeños grupos de funciones para formar combinaciones lineales fijas.

La representación matemática de las funciones gaussianas contraídas se describe a continuación [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999].

(CGTO)

$$\phi = Y_{lm} \sum_i C_i \sum_j C_{ij} e^{-\epsilon_{ij} r^2} \quad (11)$$

$Y_{lm}$  = esféricos armónicos

$r^2$  = función gaussiana.

$C_{ij}$  y  $\epsilon_{ij}$  = coeficientes de contracción y exponentes respectivamente, representan funciones estándar que permanecen constantes durante los cálculos.

Este set de coeficientes y exponentes predefinidos es lo que se conoce como conjuntos de bases contraídas.

Cada  $C_i$  puede ponderar una suma de 1-10 funciones gaussianas, llamada contracción [Foresman y Frisch, 1996; y Joung, 2001].

La contracción en funciones gaussianas se refiere a lo siguiente: En vez de aumentar el número de funciones tratando de abarcar todo el sistema molecular a estudiar, para lo cual se requerirían muchas y aumentarían el tiempo de análisis y costo computacional, además de analizar electrones que no están en orbitales de interés químico (orbitales del centro). Mejor se optó por repartirlas, se dan cierto número de funciones para los electrones de los orbitales centrales y otras para los orbitales de valencia. Se distribuyen las funciones necesarias de acuerdo a lo que se quiere analizar y al tamaño y tipo de estructura molecular. Esto ha mejorado grandemente los problemas en la representación de la distribución radial de electrones [Foresman y Frisch, 1996; Bertran, 2000; y Joung, 2001].

Las funciones gaussianas contraídas logran una mejor representación de los orbitales, comparadas con las funciones gaussianas simples, como se

puede visualizar en la figura 4, donde se observa una gran similitud con el STO. Las CGTO son la mejor opción que se tiene de momento, si sometemos a juicio la rapidez con que resuelven las integrales monoeléctricas y bielectricas, el bajo costo computacional, así como la mejor representación lograda en la distribución electrónica y forma del orbital, lo cual aumenta la precisión en los resultados obtenidos [Young, 2001].

Las funciones gaussianas son permiten mayor facilidad para calcular integrales de dos o más centros, debido a que el producto de las dos gaussianas localizadas en dos diferentes posiciones ( $R_A$  y  $R_B$ ) con diferentes exponentes ( $\alpha$  y  $\beta$ ) pueden ser escritas como una simple gaussiana localizada entre las dos posiciones originales. Esto permite fórmulas compactas para las integrales de uno y dos electrones [Young, 2001].

### Ejemplos de conjuntos de bases

#### Bases tipo Pople

Por sus características son ampliamente utilizadas, de acuerdo a [Foresman y Frisch, 1996; Jensen, 1999; y Joung, 2001].

**STO-3G:** Base mínima. Contiene el mínimo número de funciones básicas necesarias para cada orbital atómico en las capas ocupadas en el estado fundamental. Incluye 3 funciones Gaussianas primitivas. Util para moléculas muy grandes.

**3-21G:** La numeración 3-21 proviene del número de contracciones (C) aplicadas a los orbitales centrales (OC) y los orbitales de valencia (OV), la G significa el tipo de función empleada, que son las gaussianas. De tal manera que para OC = 3 funciones primitivas GTO. Para OV:  $C_1=2$  primitivas GTO,  $C_2=1$  primitiva GTO. La primera contracción ( $C_1$ ) de los orbitales de valencia describe un orbital atómico con funciones primitivas S y P, por ello se denota como 2; mientras que la segunda un orbital atómico con funciones S y se denota con una sola función primitiva. Este número de contracciones se determinó en base a los orbitales atómicos ocupados en el estado basal. También se conoce como base extendida "doble zeta", lo que significa que se le han adicionado un doble número de funciones en cada OV. Al aumentar el número de funciones puede ser que se dupliquen (como en este caso), tripliquen, etc., las funciones existentes. Aunque la extensión también puede consistir en adicionar otras funciones no presentes como d, f, etc.

La representación del aumento en funciones (contracción) quedaría así:

H: 1S,1S' C:1S,2S, 2S', 2Px 2Py, 2Pz, 2Px', 2Py', 2Pz'

La contracción 1 representada por dos primitivas (S y P) se aplicó al átomo de carbono porque generalmente esta base es muy empleada para moléculas orgánicas; sin embargo, se podría aplicar a cualquier elemento

perteneciente al segundo período de la tabla periódica, entre los que se incluyen oxígeno y nitrógeno. La contracción 2 es para el hidrógeno.

En la representación mostrada anteriormente se puede observar que los conjuntos de base indican las funciones de los orbitales de cada uno de los átomos que intervienen en la formación del orbital molecular.

6-31G: OC = 6 primitivas GTO. OV:  $C_1=3$  primitivas GTO,  $C_2=1$  primitiva GTO. Base extendida "doble zeta", igual a la anterior la diferencia es el número de funciones primitivas utilizadas en OC y  $C_1$ .

6-311G: OC = 6 primitivas GTO. OV:  $C_1=3$  primitivas GTO,  $C_2=1$  primitiva GTO,  $C_3=1$ . Esta es también una base extendida "triple zeta" (tiene tres contracciones), las cuales se pueden duplicar o triplicar, según el caso.

La utilización de un número mayor de funciones contractas en los orbitales centrales, corrige el efecto de la pendiente en la representación gráfica de los electrones cercanos al núcleo, y a la vez, la extensión de funciones en los orbitales de valencia corrige el comportamiento asintótico de la función de onda. Lo cual mejora los resultados, tanto en la forma del orbital, como en los cálculos de las propiedades moleculares.

Las bases tipo Pople tienen como característica, que cambian el tamaño del orbital, y se aplican a moléculas orgánicas para resultados cualitativos y cuantitativos.

**Polarizadas:** Bases extendidas que introducen funciones representativas de orbitales que no se encuentran ocupados en el estado fundamental del átomo, como lo son funciones "d" para carbono y oxígeno, funciones "f" para metales de transición, y funciones "p" para hidrógeno. Se denotan con \* y \*\*, el empleo de un \*, indica que se agregan funciones de polarización para los elementos del segundo y tercer período de la tabla periódica (C, O, metales de transición), y dos \*\* representan funciones agregadas para los elementos anteriores y adicionalmente funciones "p" para el hidrógeno.

Ejemplos: 3-21G\*, 6-31G\*, 6-311G\*, 6-31G\*\*.

6-31G\*\* = 6-31G (d, p) adiciona funciones de polarización p a átomos de hidrógeno y funciones d a los átomos pesados (por ejemplo C y O). Se usa cuando los hidrógenos se encuentran en sitios de interés, para calcular energías de enlace en sistemas con tamaño medio o largo. Incrementa la precisión de los cálculos de energía.

**Características de las bases polarizadas:** Hacen la función de onda más flexible (cambian tamaño y forma del orbital), aumentan la precisión en geometría y frecuencias vibracionales, decrecientan la energía variacional total por lo que se alcanza más rápido la convergencia; siendo útiles principalmente en sistemas de tamaño medio.

**Difusas:** Bases extendidas igual que las polarizadas, que incrementan grandemente el tamaño en orbitales S y P, se representan mediante + o ++

(plus) antes de G, por ejemplo: 6-31+G, 6-31++G. Son útiles para sistemas de  $e^-$  muy alejados del núcleo, pares  $e^-$  solos, aniones, estados excitados y para bajos potenciales de ionización.

Esencialmente, todos los cálculos computacionales basados en la química cuántica, usan un conjunto de base para expresar los orbitales moleculares desconocidos en términos de un conjunto de funciones conocidas. En principio cualquier tipo de funciones de base puede ser utilizada; sin embargo, hay dos aspectos a considerar para elegir las funciones de base adecuadas: uno es elegir las buscando un comportamiento acorde con la física del problema, esto asegura que la convergencia con más funciones de base añadidas es razonablemente rápida. El segundo aspecto es práctico, ya que se buscan las funciones que permitan calcular más fácilmente todas las integrales requeridas. A partir del conjunto de base seleccionado se construyen las ecuaciones de acuerdo al método utilizado, iniciándose el ciclo iterativo de campo autoconsistente (SCF) [Foresman y Frisch, 1996; Bertran, 2000; y Joung, 2001].

### **Métodos de Estructura Electrónica**

Los estados de la energía y propiedades relacionadas de una molécula, pueden ser obtenidas resolviendo la ecuación de onda de Schrödinger. Dependiendo del tipo de aproximaciones matemáticas utilizadas estos métodos se clasifican de la siguiente manera:

Semiempíricos. Se caracterizan porque algunas de las integrales que deben evaluarse, son sustituidas por datos experimentales conocidos, es decir parametrizan las soluciones aproximadas del sistema químico bajo investigación. En estos métodos se consideran únicamente los electrones de valencia, por lo tanto un mínimo conjunto de bases es utilizado. La mayoría de este tipo de métodos usan únicamente funciones s y p y las funciones de base son orbitales tipo Slater con funciones exponenciales (STO-3G) [Jensen, 1999]. Tienen como ventajas el disminuir los costos computacionales por reducir el número de integrales empleadas en los cálculos, por lo que también son más rápidos. Sin duda las ventajas más sobresalientes de estos métodos, sobre la mecánica molecular, es por una parte, que mediante el uso de datos experimentales incluye efectos de correlación electrónica. Por otra parte, están capacitados para describir la ruptura de enlaces y reacciones de formación [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999].

Algunos métodos semiempíricos tienen como límite, cálculos de moléculas de aproximadamente 1,000 átomos, por efecto del tiempo empleado en la diagonalización para obtener orbitales SCF. Sin embargo, existen otros en los que la diagonalización no es necesaria por usar escala lineal, por lo que pueden calcular sistemas con varios miles de átomos [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999].

Sus principales desventajas son: que su precisión se basa en el número de parámetros experimentales con que se cuenta (mayores datos mejor

precisión) y que tan parecidos son los sistemas químicos a comparar entre sí. Debido a la dependencia con los datos experimentales no pueden predecir compuestos desconocidos [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999].

Algunos ejemplos de esta clase de métodos son: Hückel, Hückel extendido, AM1, MINDO/3, INDO, CNDO y PM3 [Foresman y Frisch, 1996].

**Ab Initio.** Utilizan aproximaciones más rigurosas que los métodos descritos anteriormente, ya que no usan parámetros experimentales en su computación. Por esta razón son más exactos, pero también más tardados. Emplean un pequeño número de constantes físicas: velocidad de la luz, masas y cargas de electrones y constante de Planck [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999].

Proveen predicciones cuantitativas de alta calidad para un extenso rango de sistemas químicos. Son preferencialmente aplicables a moléculas que comprenden de 50 a 100 átomos. Básicamente pueden estudiar cualquier tipo de átomo, incluyendo metales, moléculas en estado excitado y en solución [Foresman y Frisch, 1996; Jensen, 1999; y Hehre, 2003].

El método más usado de ellos es el Hartree-Fock (HF). De acuerdo a este método, la energía total de una molécula esta dada no solo por la suma de las energías de los orbitales moleculares, sino por la repulsión promedio entre electrones y sus respectivos cambios de espín; es decir, considera la repulsión y cambios de espín entre un electrón y el total de electrones presentes, y es conocida como energía de intercambio [Jensen, 1999].

El cálculo de la energía HF en un sistema polielectrónico, parte del principio variacional para obtener una energía aproximada [Foresman y Frisch, 1996; Jensen, 1999; Bertran, et al., 2000].

$$E = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle \quad (12)$$

Para construir esta ecuación y darle solución, se establecen una serie de aproximaciones, a las que se les ha dado el siguiente orden:

**Primera aproximación:** La función de onda  $\Psi$ , se obtiene de la representación de los orbitales moleculares ( $\psi_i$ ), los cuales se construyen a partir de una CLOA que a su vez, cada orbital atómico se desarrolla en funciones gaussianas de los conjuntos de base ( $\phi_\mu$ ) [Bertran, et al., 2000].

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^n c_{\mu i} \phi_\mu$$

Los orbitales así contruidos, se combinan dentro del determinante de la matriz conocido como "determinante de Slater". Las columnas representan las funciones de onda de cada electrón (orbitales), mientras que las filas representan las coordenadas de los electrones, donde se incluye una cuarta coordenada para representar el espín. Los orbitales moleculares son entonces

el producto de un orbital espacial y una función de espín ( $\alpha$  o  $\beta$ ) conocidos como espínorbitales [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999].

La introducción del espín es con la finalidad de cumplir con el principio de Pauli, y también con la restricción de que la función de onda debe ser antisimétrica. De esta manera el determinante de la matriz satisface dos requerimientos de la química cuántica: uno, que hace indistinguibles a los electrones y el otro, que permite representar la antisimetría de la función de onda, ya que el intercambio de dos electrones equivale al intercambio de dos columnas con su correspondiente cambio en signo. La creación de esta matriz es lo que permite introducir el término de intercambio en los cálculos de energía Hartree-Fock [Andrés y Beltrán, 2000; y Joung, 2001].

**Segunda aproximación:** El operador Hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) lo calcula partiendo de la aproximación: Born-Hoppenheimer.

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{nn}$$

En la teoría de Hartree-Fock el Hamiltoniano se construye para cada electrón y es conocido como hamiltoniano monoeléctrico, cuya representación es  $\hat{h}(I)$ . La energía monoeléctrica es la energía que tendría cada electrón si estuviera solo en la molécula, y esta representada por la energía cinética del electrón más la energía potencial de atracción del electrón por parte de todos los núcleos de la molécula. Para calcularlo se emplea la siguiente fórmula:

$$\hat{h}(I) = -1/2 \nabla^2(I) - \sum_{a=1}^M \frac{Z_a}{r_{ai}} \quad (13)$$

Por otra parte,  $\hat{J}$  representa la repulsión coulombiana media entre dos electrones y  $\hat{K}$  la energía de intercambio media debida a los cambios de espín entre dos electrones que están descritos por la misma función de espín. Ambos son determinados tomando en cuenta la matriz densidad ( $P$ ) que deriva de los orbitales moleculares ocupados [Hehre, 2003].

$$\hat{J}_j(1)\psi_i(1) = \left( \int \psi_j(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_j^*(2) dr_2^{\vec{}} \right) \psi_i(1) \quad (14)$$

$$\hat{K}_j(1)\psi_i(1) = \left( \int \psi_j^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(2) dr_2^{\vec{}} \right) \psi_j(1) \quad (15)$$

En base a la aproximación de Born-Oppenheimer, la energía de repulsión internuclear es una constante que se suma al final para obtener la energía total.

Las ecuaciones de operadores de Hartree-Fock pueden representarse de manera condensada, quedando expresada en función de los orbitales moleculares. Cabe aclarar que estas ecuaciones fueron derivadas de moléculas con uno y dos electrones [Bertran, et al., 2000].

$$\hat{f}(1)\psi_i(1) = \varepsilon_i\psi_i(1) \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (16)$$

### Ecuaciones de Roothaan-Hall

Para calcular la energía de una molécula polielectrónica a partir de sus orbitales moleculares, se hace una combinación de la primera y segunda aproximaciones. La ecuación (5) OM = CLOA que define la función de onda ( $\Psi$ ) es introducida en la ecuación (17) que define el operador hamiltoniano Fock. De la combinación de las dos ecuaciones anteriores se genera un operador de Fock, el cual queda establecido en función de los orbitales, y su expresión es la siguiente:

$$\sum_{v=1}^K c_{vi} \langle \phi_\mu(1) | \hat{f}(1) | \phi_v(1) \rangle = \sum_{\mu=1}^K c_{vi} \varepsilon_i \langle \phi_\mu(1) | \phi_\mu(1) \rangle \quad (17)$$

$$\mu = 1, 2, 3, \dots, K$$

A partir de la ecuación (18), se obtienen una serie de integrales, que representadas como ecuaciones adquieren la siguiente forma:

$$\sum_{v=1}^N (F_{\mu v} - \varepsilon_i S_{\mu v}) C_{vi} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, N \quad (18)$$

Los elementos de estas ecuaciones también son agrupados en diferentes matrices, que representadas en forma algebraica y compacta, reciben el nombre de ecuaciones de Roothaan-Hall [Foresman y Frisch, 1996; Bertran, et al., 2000; y Hehre, 2003].

$$FC = SC\varepsilon \quad (19)$$

S = recubrimiento o traslape de orbitales.

$\varepsilon$  = energías de los orbitales.

F = operadores Fock, representan hamiltonianos bielectrónicos analogos a los de la ecuación de Schödinger para cada orbital ( $F_{\mu v} = H_{\mu v}^{\text{centro}} + J_{\mu v} + K_{\mu v}$ ).

C = coeficientes que definen los orbitales moleculares.

**Tercera aproximación:** aplicación del principio variacional. Mediante esta aproximación se trata de encontrar los espín-orbitales, que hacen que la variación de primer orden de la energía sea cero. Los coeficientes C, que representan los multiplicadores indeterminados de Lagrange, son los que conducen al estado de mínima energía, por lo que la tarea es encontrar cual es la mejor combinación de coeficientes. Para ello se inicia un ciclo iterativo [Jensen, 1999; y Bertran, et al., 2000]:

-Los primeros coeficientes se toman de la matriz de determinantes Slater (espínorbitales), la cual constituye una función de onda de prueba.

-Se calculan valores para  $f$  de la ecuación del operador Fock, donde se define al operador en función de los orbitales moleculares. Con estos valores se construye una matriz  $F$ , la cual se diagonaliza.

-Los nuevos coeficientes obtenidos de la diagonalización se usan para construir otros orbitales con otros coeficientes  $C$ . Estos se diagonalizan y así se continúa hasta que los coeficientes de la última iteración difieran en un orden de  $10^{-9}$  de la iteración anterior. Cuando esto sucede se dice que el sistema molecular ha convergido y se tiene una geometría optimizada al mínimo valor de energía posible. Este proceso se conoce como campo autoconsistente (SCF).

El método descrito anteriormente se conoce como Hartree-Fock restringido (RHF) o capa cerrada, y es útil para moléculas neutras donde los orbitales se encuentran doblemente ocupados, cada uno conteniendo dos electrones de espín opuesto. Los cálculos a capa cerrada construyen sus ecuaciones considerando al par de electrones dentro de un mismo orbital espacial [Foresman y Frisch, 1996].

Cuando la molécula posee uno o mas electrones desapareados (iones, radicales), o se encuentra en estado excitado, entonces son tratadas con un método de capa abierta o no restringido (UHF), en el que se emplean orbitales espaciales separados para electrones con espín  $\alpha$  y  $\beta$  [Foresman y Frisch, 1996; y Bertran, et al., 2000]. Ambos orbitales son construidos con el mismo conjunto de base, pero emplean dos diferentes conjuntos de coeficientes de expansión de orbitales moleculares [Young, 2001]:

$$\phi_i^\alpha = \sum C_{\mu i}^\alpha x_\mu \quad (20)$$

$$\phi_i^\beta = \sum C_{\mu i}^\beta x_\mu$$

Los dos conjuntos de coeficientes resultan en dos conjuntos de matrices Fock, con sus respectivas matrices de densidad. Representan correctamente los orbitales deslocalizados para sistemas resonantes; sin embargo, la eigenfunción no es un estado de espín puro, sino que contiene alguna cantidad de contaminación de espín, desde altos estados. Por ejemplo: los dobletes son contaminados con cuartetos y otros estados de espín mas altos [Foresman y Frisch, 1996].

La contaminación de espín  $\langle S^2 \rangle$  es un error no sistemático, que se debe a la presencia en alto grado de la polarización de espín, y trae como consecuencia una ligera disminución de la energía total calculada, aunque más frecuentemente la incrementa. La diferencia de energía entre distintos estados, puede ser adversamente afectada. Una alta contaminación de espín puede afectar la geometría, análisis de cargas, la densidad de espín y la convergencia. Los métodos HF y post-HF, son susceptibles a la contaminación de espín, mientras que en otros como DFT no es común encontrarla [Young, 2001].



Un tercer método HF, empleado para representar electrones desapareados en una molécula, es el ROHF. Por una parte, considera orbitales moleculares doblemente ocupados (sin separar en  $\alpha$  y  $\beta$ ) y, por otra, las capas abiertas formadas por orbitales monoocupados. Las funciones de onda ROHF se consideran funciones propias de  $\hat{S}^2$ , por lo que describen estados de espín puros. Sin embargo, es menos flexible que UHF, ya que no considera la polarización de espín del sistema [Bertran, 2000].

La polarización de espín es un efecto que se presenta en sistemas con un número impar de electrones, donde existe un electrón desapareado en un orbital molecular simplemente ocupado (SOMO). Tal efecto consiste en que el electrón desapareado interactúa con los restantes de niveles de energía inferior, con los de su mismo espín genera una integral de Coulomb (repulsión) y otra de intercambio, mientras que con los de espín contrario solo origina la integral de Coulomb [Bertran, 2000].

La desventaja más grande que posee el método HF, es que no considera la energía proveniente de la correlación de electrones, es decir aquellos cambios experimentados por un electrón en relación a cada uno de los restantes electrones presentes. En este método la probabilidad de que un electrón se encuentre en un cierto punto del espacio es independiente de la posición instantánea del otro electrón y, por lo tanto, el movimiento de los dos electrones no está correlacionado; lo cual conduce a errores en los cálculos de energía total [Foresman y Frisch, 1996; y Bertran, et al., 2000].

Se ha estimado que la energía vibracional de un sistema molecular calculada mediante HF, puede llegar a ser sobreestimada en un 10-12%, por efecto de errores sistemáticos debidos a la carencia de una buena metodología para estimar la energía de correlación electrónica, y este error puede incrementarse hasta un 15% por efecto del conjunto de base empleado. Considerando que la energía vibracional es una de las partes componentes de la energía total, implica que el cálculo de energía total se puede ver afectado en la misma magnitud [Foresman y Frisch, 1996].

La energía generada por los procesos de intercambio y correlación electrónica, constituye una corrección que debe ser aplicada a la energía total, para obtener una solución aproximada a la de un sistema molecular real [Bertran, et al., 2000].

De acuerdo a Foresman y Frisch, (1996), dentro de los métodos *ab initio*, desarrollados posteriormente al HF, los cuales si contemplan la correlación de electrones, se encuentran:

- Teoría de perturbaciones de Moller-Plesset, entre los que se incluyen MP2, MP3, MP4 y MP5.
- Energías cuadráticas CI, como el QCISD, QCISD(T), QCISD(Q).
- Métodos de cluster acoplado, por ejemplo, CCSD, CCSD(T).
- Dobles energías de Brueckner, como BD, BD(T) y BD(TQ).

Los métodos post-HF, ofrecen la ventaja de ser muy precisos en la estimación de la energía de correlación, pero tienen la desventaja de tener altos requerimientos computacionales, lo cual eleva su costo, además que son efectivos principalmente en sistemas moleculares pequeños (6 átomos) [Curtiss y Ragachavari, 1998].

Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT). Es similar a los métodos ab initio, pero menos cara. Durante las dos décadas pasadas, DFT ha experimentado una incrementada popularidad como una eficiente y versátil herramienta para obtener información precisa de sistemas moleculares de interés. Dicha popularidad se debe principalmente a nuevas y más confiables aproximaciones para los términos de intercambio y correlación en la energía funcional. Esas características hacen posible adquirir un nivel correlacionado para moléculas grandes, y por lo tanto, los métodos basados en DFT representan una alternativa a la teoría de Hartree-Fock (HF), o incluso para los métodos post-HF más tradicionales, tales como la teoría Moller-Plesset, Cluster-acoplado o interacción de configuración, los cuales son altamente demandantes en términos de CPU y por lo mismo son caros [Bertran, et al., 2000].

El desarrollo matemático para DFT, parte del primer teorema de Hohenberg y Kohn, el cual afirma: "La energía electrónica del estado basal puede ser determinada completamente, si se conoce la densidad electrónica  $\rho(r)$ " [Bertran, et al., 2000]. Se fundamenta en una fórmula análoga a la ecuación de onda de Schrödinger independiente del tiempo, establecida por Euler-Lagrange [Geerlings, et al, 2003], y es la siguiente:

$$v(\mathbf{r}) + \frac{\delta F_{\text{HK}}}{\delta \rho(\mathbf{r})} = \mu \quad (21)$$

Donde:

$\rho(r)$  = densidad electrónica

$v(r)$  = potencial externo del núcleo

$F_{\text{HK}}$  = funcional Hohenberg-Kohn

$\mu$  = multiplicador de Lagrange

A partir de esta ecuación, surgen las aproximaciones que darán como resultado la  $\rho(r)$  que corresponde a la geometría de mínima energía del sistema molecular, así como del resto de propiedades que se derivan de ella. Mientras que en HF las aproximaciones son derivadas de una ecuación diferencial (onda), en DFT provienen de un funcional ( $F_{\text{HK}}$ ) de densidad electrónica.

**Primera aproximación.** Método de Kohn y Sham. El análogo a la función de onda ( $\Psi$ ) es la densidad electrónica  $\rho(r)$ , para calcularla se debe empezar por construir orbitales moleculares ( $\psi_i$ ) de manera similar a Hartree-Fock, así la densidad electrónica queda expresada como una función orbital. Los orbitales iniciales (de prueba), son construidos por las funciones del conjunto de bases seleccionado, y son útiles para calcular la densidad electrónica que dará inicio al ciclo iterativo. Para ello, se hace uso de un grupo de ecuaciones de un electrón desarrolladas por Kohn-Sham, análogas a las de Roothaan-Hall en HF, como se muestra a continuación [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al, 2003].

$$\rho(\mathbf{r}) = \int \sum_i^N |\Psi_i(\mathbf{x})|^2 d\sigma \quad (22)$$

Donde,  $\mathbf{x}$  denota los cuatro vectores que contienen las variables de coordenadas espaciales y espín de los electrones, y la integración es enfocada sobre la variable de espín  $\sigma$  [Geerlings, et al, 2003].

**Segunda aproximación:** El primer teorema de Hohenberg y Kohn, también establece que: “a partir de la densidad electrónica  $\rho(\mathbf{r})$  se pueden obtener, el potencial externo  $v(\mathbf{r})$  generado por los núcleos y el número de electrones  $N$ . A su vez, la combinación de  $N$  y  $v(\mathbf{r})$  determinan el operador hamiltoniano del cual finalmente deriva la energía” (ver Diagrama 1).  $v_{\text{eff}}(\mathbf{r})$  representa la introducción de un potencial externo efectivo, ya que incluye el potencial externo generado por el intercambio y correlación electrónica [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al, 2003].

$$v_{\text{eff}}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{XC}(\mathbf{r}) \quad (23)$$

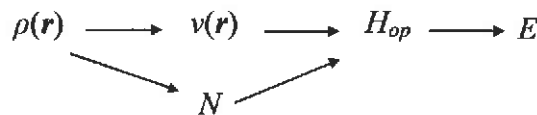


Diagrama 1. Primer teorema Hohenberg y Kohn

Partiendo del diagrama 1, se establece que la energía y el operador hamiltoniano, son funcionales de la densidad electrónica,

$$E = E_v[\rho] \quad (24)$$

Conociendo  $\rho(\mathbf{r})$ ,  $v(\mathbf{r})$ , y  $N$ , se procede a calcular el hamiltoniano o funcional de energía para DFT. El funcional propuesto por Hohenberg y Kohn se construye empleando las ecuaciones de Kohn-Sham, así como la aproximación Born-Oppenheimer, y queda expresado de la siguiente manera:

$$F_{HK}[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (25)$$

El funcional  $F_{HK}[\rho]$  representa la energía electrónica total de la molécula, y pudo ser desarrollado por Kohn y Sham, al considerar un sistema de referencia de  $2N$  electrones descrito por orbitales  $\psi_i$  sin interacción electrón-electrón, haciendo coincidir su  $\rho(\mathbf{r})$  con la de un sistema real, en donde se da la

interacción electrón-electrón [Andrés y Beltrán, 2000; Bertran, et al., 2000; y Geerlings, et al., 2003].

$T_s[\rho]$ , corresponde al funcional de la energía cinética del sistema de referencia de 2N electrones descrito anteriormente, el cual opera bajo un potencial externo  $v_s(r)$  y es totalmente dependiente de los orbitales  $\psi_i$ , como lo muestra la presente ecuación [Bertran, et al., 2000; y Geerlings, et al., 2003]:

$$T_s[\rho] = \sum \langle \Psi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \Psi_i \rangle \quad (26)$$

El potencial  $v_s(r)$  posee la propiedad que aplicado al sistema molecular genera una función de onda  $\Psi_s$ , que tiene la misma densidad que el sistema real. En este sistema se dan interacciones coulómbicas entre núcleos y es considerado un sistema ideal, donde el hamiltoniano sólo contiene los términos monoeléctronicos y no presenta interacción electrón-electrón, por lo que aplicando el método HF da una solución exacta [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al., 2003].

$$\left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{\text{eff}}(\mathbf{r})\right) \psi_i = \epsilon_i \psi_i \quad (27)$$

$J[\rho]$  es el funcional que representa la energía clásica de interacción coulómbica electrón-electrón y núcleo-electrón [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al., 2003].

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \quad (28)$$

Mientras que,  $E_{xc}[\rho]$  es el funcional de energía de intercambio y correlación. La energía cinética exacta para el sistema real es diferente al sistema de referencia descrito, por lo que la diferencia entre éstas da la energía cinética de intercambio y correlación de los electrones [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al., 2003].

$$E_{XC}[\rho] = \int \rho(\vec{r}) v_{XC}(\vec{r}) d\vec{r} \quad (29)$$

Expresada de otra forma la ecuación de intercambio y correlación queda:

$$E_{xc}[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho] + E_{ee}[\rho] - J[\rho] \quad (30)$$

Puede observarse que  $E_{xc}[\rho]$  engloba el resto de la energía cinética, que no se tomó en cuenta en  $T_s[\rho]$ , además de la energía de interacción no clásica electrón-electrón [Bertran, et al., 2000].

**Tercera aproximación.** Se basa en el segundo teorema de Hohenberg-Kohn que aplica el principio variacional, y establece lo siguiente: "cualquier densidad de prueba da una energía superior o igual a la energía exacta del estado fundamental; por lo que para obtener la densidad exacta del estado fundamental se tiene que encontrar la densidad que minimiza el sistema". [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al., 2003].

Para calcular la energía de un sistema polielectrónico de  $N$  electrones, al igual que en el método HF se parte de un conjunto de orbitales moleculares de prueba ( $\psi$ ). Mediante las ecuaciones presentadas anteriormente se calcula la densidad electrónica, después el potencial externo, así como el número de electrones, y a partir de aquí el hamiltoniano. Sustituyendo todos estos valores en la ecuación de DFT análoga a la de Schrödinger, se determina el coeficiente o multiplicador de Lagrange ( $\mu$ ) que se utiliza en la minimización restringida. Este proceso es iterativo, por lo que también pertenece a los métodos de campo autoconsistente (SCF) y debe repetirse hasta llegar a la convergencia [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al., 2003].

La calidad de los coeficientes y orbitales supuestos inicialmente influyen el número de iteraciones necesarias para llegar a la convergencia. También en ocasiones hacen la diferencia entre convergencia y divergencia. Para determinar los coeficientes iniciales de los orbitales moleculares pueden utilizarse procedimientos más sofisticados, como la teoría de Hückel o Hückel extendido. Estos métodos tienen la ventaja que son fácilmente parametrizados para todos los elementos, y puede proveer orbitales iniciales para sistemas involucrando elementos de esencialmente toda la tabla periódica [Jensen, 1999]. El programa Gaussian-03 utilizado en este trabajo, emplea por default el método de Hückel para calcular los coeficientes de orbitales de la función de onda de prueba en el método HF, y también en DFT.

DFT, permite obtener buenas geometrías, momentos dipolares, excelentes frecuencias vibracionales y buena estimación termoquímica. Ofrece resultados precisos tanto en sistemas a capa cerrada como abierta, sin contaminación de espín. Es recomendable para moléculas entre 50 y 100 átomos, permitiendo trabajar con todos los átomos que constituyen la tabla periódica. No es adecuada para sistemas con enlaces débiles como los de Vander Waals, disociación de enlaces en iones, ni en sistemas con un único electrón. [Ziegler, 1991; Bertran, et al., 2000; y Bottoni, et al, 2002].

#### Diferencias entre los métodos de Funcionales de la Densidad y Hartree-Fock

En DFT se utiliza un hamiltoniano aproximado, sin embargo, la densidad electrónica final es potencialmente exacta. El único error es usar un potencial de intercambio y correlación aproximado. En HF el hamiltoniano es exacto, pero la función de onda de prueba, a partir del determinante de Slater es siempre una solución aproximada [Andrés y Beltrán, 2000].

Otra diferencia importante es que en HF se minimiza la energía respecto a los coeficientes de expansión LCAO, manteniendo los orbitales ortonormalizados con los coeficientes indeterminados de Lagrange. En este proceso tienen significado físico los orbitales moleculares y sus energías. En

DFT se minimiza el funcional de la energía con respecto a la densidad electrónica, con la restricción de que la integral de la densidad sea el número total de electrones. En este caso solo la densidad electrónica y el coeficiente de Lagrange ( $\mu$ ) utilizado en la minimización restringida, tienen significado físico. No tienen significado físico estricto ni los orbitales moleculares Kohn-Sham ni sus energías, ni la función de onda, ni su cuadrado [Andrés y Beltrán, 2000].

**Funcionales.** Matemáticamente representan la función de otra función. Una función produce resultados de un conjunto de variables, mientras que un funcional produce resultados a partir de una función [Foresman y Frisch, 1996; y Jensen, 1999]. Los funcionales desarrollados en DFT para conocer la mínima energía de un sistema molecular, constituyen una aproximación al potencial y energía de correlación-intercambio, ya que es la parte de la energía electrónica difícil de conocer. [Geerlings, et al., 2003]. Se han desarrollado varios tipos de funcionales, que se agrupan en tres clases, de acuerdo a las aproximaciones empleadas para estimar  $E_{xc}$ . Todos ellos tienen la particularidad de haber sido desarrollados empleando como modelo un sistema gaseoso [Bertran, et al., 2000].

**Funcionales Locales o de densidad local (LDA).** Estos funcionales dependen exclusivamente de la densidad y se han desarrollado empleando como modelo un gas uniforme de electrones. Se asume que los efectos de correlación-intercambio son locales y dependen únicamente del valor de la densidad electrónica en cada punto. Por ello, las contribuciones de correlación e intercambio se tratan separadamente. Funcionan muy bien en sistemas en los que la densidad se mantiene aproximadamente constante. No son adecuados para describir enlaces débiles, ni predicciones termoquímicas. El funcional LDA más sofisticado es el SVWN, donde se combina la parte de intercambio desarrollada por Slater, 1951, y la parte de correlación desarrollada de Vosko, Wilk y Nusair, 1980 [Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000; y Bertran, et al., 2000].

**Funcionales de Gradiente Corregido (GGA).** Constituyen una forma corregida y mejorada de los funcionales LDA. En estos funcionales la energía de correlación-intercambio, no solo depende de la densidad, sino del gradiente de ésta. Así, se tiene en cuenta el valor de la densidad en cada punto y su variación en cada uno de los puntos. Resultan muy útiles para geometrías, frecuencias vibracionales y densidades de carga. Funcionan razonablemente bien para sistema con enlaces por puentes de hidrógeno. Para calcular la energía de intercambio se cuenta con el funcional desarrollado por Becke (B), en 1988, para correlación con el funcional de Perdew y Wang, 1991 (PW91), y con el funcional de Lee, Yang y Parr (LYP). La combinación de funcionales de intercambio y correlación da lugar a funcionales completos como, BPW91 y BLYP [Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000; y Bertran, et al., 2000].

**Funcionales Híbridos.** Son aquéllos que incorporan parte de la energía de intercambio exacto procedente de un cálculo HF, al funcional de intercambio

DFT, su representación general se muestra en la ecuación (32). A este tipo de funcionales se les conoce como no locales, al igual que los GGA. Pertenecen a ellos el B3P86, formado por combinar el funcional de intercambio de tres parámetros desarrollado por Becke en 1993 y el de correlación de Perdew en 1986. Otros de los más utilizados son: B3LYP, formado por el Becke 3 para intercambio y Lee, Yang y Parr para correlación (ecuación 33), y el PBE0PBE, desarrollado por Perdew, Burke, Erzenhorff para intercambio y correlación, mostrado en la ecuación (34) [Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000; y Bertran, et al., 2000].

$$E_{\text{Hybrid}}^{\text{XC}} = c_{\text{HF}} E_{\text{HF}}^{\text{X}} + c_{\text{DFT}} E_{\text{DFT}}^{\text{XC}} \quad (31)$$

$$E_{\text{B3LYP}}^{\text{XC}} = E_{\text{LDA}}^{\text{X}} + c_0 (E_{\text{HF}}^{\text{X}} - E_{\text{LDA}}^{\text{X}}) + c_x \Delta E_{\text{B88}}^{\text{X}} + E_{\text{VWN3}}^{\text{C}} + c_c (E_{\text{LYP}}^{\text{C}} - E_{\text{VWN3}}^{\text{C}}) \quad (32)$$

$$E_{\text{XC}}^{\text{ACMO}} = E_{\text{XC}}^{\text{GGA}} + \frac{1}{4} (E_{\text{X}}^{\text{HF}} - E_{\text{X}}^{\text{GGA}}) \quad (33)$$

Como se puede observar en la ecuaciones (33) y (34), los funcionales híbridos son construidos al combinar intercambio HF con DFT, y también por una combinación de intercambio y correlación obtenidos a través de funcionales de densidad local y de gradiente corregido [Foresman y Frisch, 1996].

Para el desarrollo del funcional B3LYP, se empleó la combinación de funcionales LDA como el VWN3, y de GGA como el B88 y el LYP, además del intercambio HF. Con la finalidad de corregir las deficiencias de los funcionales LDA y GGA, Becke hizo uso de tres parámetros, los cuales obtuvo al calcular las energías de atomización, potenciales de ionización y afinidades protónicas de los átomos pertenecientes al primer período de la tabla periódica, empleando el método G1. El primer parámetro denominado  $c_0$  con un valor de 0.20, permite cualquier mezcla de intercambio HF y LDA, el segundo  $c_x$  con un valor de 0.72, permite la corrección del gradiente en los funcionales LDA empleados, y el tercero  $c_c$  con valor 0.81, representa una corrección específica para el funcional VWN3 vía el funcional LYP [Foresman y Frisch, 1996].

El funcional PBE0PBE, deriva de la combinación del funcional de gradiente generalizado PBE con una cantidad predefinida de intercambio exacto HF [Adamo y Barone, 1999]. A su vez el funcional PBE fue obtenido a partir del funcional de correlación GGA de Perdew y Wang (PW), al cual le fue adicionada una nueva parte de intercambio, para obtener un funcional que conjuntara ambas partes: intercambio y correlación ( $E_{\text{XC}}$ ) [Perdew y Wang, 1986; y Perdew, et al., 1996].

Todos los funcionales que se han desarrollado en la búsqueda de las energías de intercambio y correlación exactas, parten de la fórmula de conexión adiabática, la cual conecta el sistema de referencia sin interacción electrónica

propuesto por Khon-Sham ( $\lambda = 0$ ), con el sistema real ( $\lambda = 1$ ), tratando de encontrar una densidad electrónica común [Gunnarson y Lundqvist, 1976]. La fórmula es la siguiente:

$$E_{XC} = \int_0^1 d\lambda E_{XC,\lambda} \quad (34)$$

Partiendo de esta fórmula se han desarrollado varios esquemas híbridos, basados en el funcional de intercambio de tres parámetros empíricos de Becke. Sin embargo, más recientemente Becke ha sugerido que para describir el radio de intercambio híbrido HF/DFT, se requiere un solo parámetro no empírico, lo cual facilita los cálculos. Perdew y Col., propusieron un coeficiente basándose en la teoría de perturbación de cuarto orden MP, en vez de G1 como en B3. Los resultados fueron satisfactorios y de aquí se estableció una familia de funcionales de conexión adiabática con un solo parámetro fijo que define el intercambio HF y es referido como ACM0, el cual ya fue representado en la fórmula (34) [Becke, 1996; y Perdew, et al., 1997].

El funcional derivado de ACM0 es referido como PBE0PBE en relación a sus creadores, y también como PBE1PBE, debido a que el porcentaje de intercambio híbrido HF/DFT está definido por un solo parámetro fijo que indica la parte de intercambio HF, el cual corresponde en este caso a un 25% y el restante 75% es debido a DFT [Foresman y Frish, 1996; y Adamo y Barone, 1999].

Las correcciones efectuadas por Perdew, Burke y Erzenhorff al funcional de intercambio PW, lograron mejorar la caracterización de las interacciones covalentes de los sistemas moleculares, obteniéndose mejores resultados [Adamo y Barone, 1999].

Los funcionales híbridos B3LYP y PBE1PBE ofrecen resultados de precisión comparable a los post-HF, a un tiempo y costo considerablemente menor en sistemas con un mayor número de electrones a los que pueden ser evaluados por los métodos post-HF [Bertran, et al., 2000].

### **Químicas Modelo**

Una química modelo es una construcción teórica que es usada en la estimación de la estructura, energía, y otras propiedades de las moléculas [Ochterski, 1995].

Comúnmente una química modelo se define mediante la aplicación de un determinado método teórico, con un conjunto de bases específico. Sin embargo, la búsqueda de resultados de mayor precisión, reproducibles, confiables, efectivos y bajo costo computacional, que puedan ser aplicados a un mayor número de sistemas moleculares, ha motivado el desarrollo de químicas modelo compuestas, en las que se emplean diferentes niveles de teoría basadas en la combinación de distintos métodos teóricos y diferentes conjuntos de bases [Foresman y Frisch, 1996].

La mayoría de las químicas modelo compuestas desarrolladas hasta el momento, se han enfocado a métodos Hartree-Fock y post-Hartree-Fock,



entre ellas, las implementadas en el paquete computacional de Gaussian: Gaussian-n métodos Gn (G1, G2, G2(MP2)) y los métodos de conjuntos de bases completas CBS (CBS-4, CBS-q, CBS-Q, CBS-APNO). Estas químicas modelo incluyen varias etapas para determinar energías totales lo mas exactas posibles, las cuales son de gran utilidad principalmente para cálculos termoquímicos, ya que incluyen factores escala para la corrección de la energía del punto zero (ZPE). Como ejemplo, en la Tabla 1 se muestran las etapas a través de las cuales operan los métodos G2 y CBS-Q [Foresman y Frisch, 1996, Ochterski, et al., 1996].

Tabla1. Etapas de las químicas modelo compuestas, G2 y CBS-Q

Etapa	Química Modelo	
	G2	CBS-Q
1	HF/6-31G(d) Opt Freq	UHF/6-31G <sup>†</sup> Opt Freq
2	MP2(total)/6-31G(d) Opt	MP2(FC)/6-31G <sup>†</sup> Opt
3	MP4/6-311G(d,p) <sup>†</sup>	UMP2/6-311+G(3df,2df,2p)
4	MP4/6-311+G(d,p)	MP4(SDQ)/6-31+G(d,(f),p)
5	MP4/6-311G(2df,p)	QCISD(T)/6-31+G <sup>†</sup>
6	QCISD(T)/6-311G(d,p) <sup>†</sup>	
7	MP2/6-311+G(3df,2p)	

Las primeras dos etapas de ambos métodos son destinadas a obtener las estructuras de equilibrio, y las subsecuentes etapas, a las correcciones de energía. La etapa 5 del método G2, impone limitaciones que restringen su aplicación a moléculas no mayores de seis átomos pesados en un hardware y software comunes. La etapa 3 del método CBS-Q, es donde se aplica la extrapolación de la energía característica de estos métodos, y es a lo que se atribuye su precisión [Montgomery, et al., 1999].

Como es conocido, la energía exacta solo es posible obtenerla empleando conjuntos de bases infinitas, sin embargo, esto no es práctico, por lo que se recurre al uso de conjuntos de base finitas, lo cual conlleva a efectos de truncación de bases. La magnitud de tales efectos determina la precisión en los cálculos de energías totales. Con la finalidad de evitar o minimizar los efectos de truncación de bases fueron desarrollados los métodos CBS, cuya característica distintiva es la extrapolación de energía empleando conjuntos de bases finitas, permitiendo mejores resultados. El uso de una convergencia asintótica del tipo  $N^{-1}$ , aplicada a la teoría MP de segundo orden en pares de orbitales naturales expandidos, es lo que permite la extrapolación de energía a los métodos CBS [Foresman y Frisch, 1996; y Petersson y Al-Laham, 1991].

Los métodos CBS fueron desarrollados por Petersson y Col., como una alternativa a los métodos Gn (G2) por su costo elevado. La realización de cálculos de alto nivel teórico (etapas 4 y 5) empleando conjuntos de base de tamaño medio o pequeño, es lo que permite a los métodos CBS reducir significativamente los costos [Foresman y Frisch, 1996].

Las químicas modelo compuestas que incluyen en sus etapas iniciales métodos UHF y UMP, son más susceptibles a contaminación de espín y pueden dar lugar a la estimación de geometrías y frecuencias no confiables.

Se ha comprobado que pequeños errores en la geometría molecular, conduce a grandes errores en energía en especies químicas con alta contaminación de espín. Adicionalmente el empleo de dos métodos distintos, para la optimización y cálculo de ZPE, con el fin de reducir costos, puede conducir a dos puntos estacionarios cualitativamente diferentes, con resultados erróneos en la energía. Esta situación puede complicarse aún más, cuando se estudian estados de transición en reacciones químicas [Montgomery, et al., 1999].

Considerando que DFT es una excelente herramienta en los cálculos de geometrías optimizadas y frecuencias vibracionales, además que los efectos de contaminación de espín son mínimos o nulos, se optó por combinar los métodos de DFT con los CBS [Montgomery, et al., 1999]. De acuerdo a Bauschlicher y Partridge, 1995, la combinación de DFT con procedimientos de extrapolación como CBS, incrementa remarcablemente la precisión y confiabilidad, especialmente en geometrías y campos de fuerza armónicos.

Sobre estas bases fue desarrollada, por Montgomery, et al., 1999, una química modelo denominada CBS-QB3, empleando el funcional B3LYP en combinación con el método CBS-Q. Básicamente, el funcional B3LYP en unión con el conjunto de bases 6-31G<sup>†</sup>, sustituyeron las dos primeras etapas del método CBS-Q, correspondientes a UHF/6-31G<sup>†</sup> y MP2(FC)/6-31G<sup>†</sup> como se mostrara anteriormente en la tabla 1. De esta manera con un solo método pueden obtenerse la geometría optimizada y las frecuencias vibracionales que determinan ZPE. Al comprobar la eficacia de la química modelo CBS-QB3, se encontraron resultados a un nivel de precisión comparable al método G3, el cual representa la versión actualizada del G2, descrito anteriormente [Montgomery, et al., 1999].

### **Propiedades Moleculares**

Las propiedades moleculares son totalmente dependientes de la estructura, y son gobernadas por efectos electrónicos que las hacen características de cada compuesto. Se clasifican de acuerdo al efecto que se analiza.

Optimización de Geometría. Antes de realizar cualquier cálculo computacional debe especificarse la geometría del sistema molecular que se requiere estudiar y optimizarla, es decir, se deben localizar los puntos estacionarios que representan los mínimos en su superficie de energía potencial. Para ello se inicia con la construcción de una matriz Z, que permite conocer la posición de cada átomo dentro de un sistema de coordenadas. Esta ubicación facilita la descripción de las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros que describen la geometría molecular del estado basal [Foresman y Frisch, 1996; y Bertran, et al., 2000].

Una de las técnicas más recomendables para optimización, que se incluye en el paquete computacional Gaussian-03, es la de gradiente. El gradiente es definido como la primera derivada de la energía respecto a la posición nuclear, y representa la parte negativa de las fuerzas que se concentran en un determinado punto de la estructura molecular. La suma del gradiente y las fuerzas moleculares se anulan debido a que son de la misma

magnitud y de signo contrario; cuando esto sucede al punto localizado en la superficie de energía potencial donde las fuerzas son cero se le denomina punto estacionario. Mediante la técnica de gradiente se computariza la energía y el gradiente en los diferentes puntos moleculares, el gradiente indica la dirección a lo largo de la superficie molecular donde la energía decrece, localizando así los puntos estacionarios de las estructuras moleculares en el estado basal [Foresman y Frisch, 1996].

Se dice que una geometría molecular esta optimizada cuando sus fuerzas sobre cada átomo son cero; sin embargo, para evitar la identificación prematura de los mínimos, Gaussian incluye cuatro criterios que confirman la convergencia [Foresman y Frisch, 1996]:

1. El primero de ellos se basa en las fuerzas, las cuales considera son cero cuando su máximo componente posee un valor menor a 0.00045 en todas las direcciones del plano molecular.
2. Como apoyo estadístico, la raíz cuadrada media (RMS) de las fuerzas debe ser menor a 0.0003.
3. El desplazamiento hacia el siguiente punto de la superficie de energía potencial de la estructura molecular debe ser menor a 0.0018. Los puntos que se encuentran a muy corta distancia de un mínimo, deben dar pequeños cambios en energía, pero no menores respecto al mínimo.
4. El valor de RMS del desplazamiento resulta menor a 0.0012.

Una vez establecida la geometría molecular de mínima energía, el resto de propiedades electrónicas que se derivan se consideran confiables.

Frecuencias Vibracionales. Las frecuencias vibracionales dependen de la segunda derivada de la energía respecto a la posición del núcleo, y son determinadas sobre los puntos estacionarios que se obtienen después de la optimización, siendo de gran utilidad en los siguientes propósitos [Foresman y Frisch, 1996]:

- para verificar si los puntos localizados en la estructura molecular son mínimos verdaderos correspondientes al estado basal, lo cual se corrobora por la ausencia de frecuencias con valores negativos. Además las fuerzas que representan los mínimos se mantienen constantes en todas las direcciones del plano molecular.
- Permite identificar estados de transición, ya que estos se caracterizan por presentar frecuencias negativas y por comportarse como mínimos en algunas direcciones y como máximos en una o más direcciones.
- predicen los espectros Infrarrojo (IR) y Raman de las moléculas.
- Calculan vibraciones del punto cero y correcciones a la energía termal necesarios para cálculos de energías electrónicas totales y propiedades termoquímicas aproximadas a las de un sistema molecular real.

Propiedades Termoquímicas. Estas propiedades determinan cuantitativamente la estabilidad de las moléculas en relación a su energía., constituyen una parte central para las reacciones químicas y son críticas para muchas aplicaciones a nivel industrial [Irikura y Frurip, 1997].

Aún cuando la termoquímica esta íntimamente conectada con procesos energéticos microscópicos que implican transferencia de electrones, su aplicación en un sistema molecular real es a nivel macroscópico. Considerando que los cálculos a partir de la ecuación de onda de Schrödinger y la ecuación de densidad electrónica de Euler-Lagrange, únicamente permiten obtener la energía electrónica, es necesario efectuar correcciones para transformarla en energía de reacción total, comparable a la que se determinada en forma experimental.

Para obtener computacionalmente cantidades termoquímicas como entalpías, entropías, energía libre de Gibbs, energías de atomización, y potenciales de ionización, entre otras, es necesario añadir a los cálculos químico-cuánticos aproximaciones basadas en termodinámica estadística, para obtener los términos adicionales que permitan obtener la energía total del sistema molecular. La energía total de un sistema macroscópico esta representada para un gas ideal mediante la siguiente ecuación [Bertran, et al., 2000]:

$$E_T = E_e + E_t + E_r + E_v \quad (35)$$

Donde cada término representa:

$E_T$  = Energía total

$E_e$  = Energía electrónica

$E_t$  = Energía traslacional

$E_r$  = Energía rotacional

$E_v$  = Energía vibracional

La energía traslacional es generada por el movimiento a través del espacio, y es calculada por la suma de todos los niveles de energía traslacional que están disponibles en una molécula confinada a una caja cúbica de volumen  $V = RT/p$  (volumen molar de un gas ideal a temperatura  $T$  y presión  $P$ ) [Irikura y Frurip, 1997]. Una traslación es un movimiento en el que cada punto del cuerpo se mueve la misma distancia en la misma dirección, y es dependiente de la temperatura absoluta; por ello la energía cinética traslacional total de una mol de un gas viene dada por  $E_t = 3/2RT$  [Levine, 2004].

La energía rotacional es generada por la libre rotación de una molécula y es cuantizada por el momento angular, cuyas proyecciones son múltiplos enteros de  $h/2\pi$ , lo cual la restringe a ciertos niveles discretos [Irikura y Frurip, 1997]. Una rotación es un movimiento en el que la orientación espacial del cuerpo cambia, pero las distancias entre todos los puntos del cuerpo permanecen fijas y el centro del cuerpo de masas no se mueve, de manera que no hay traslación [Levine, 2004]. Excepto para temperaturas muy bajas, la energía rotacional de una mol de un gas es  $E_r = RT$  para moléculas lineales y  $3/2RT$  para moléculas no lineales [Levine, 2004]. La aproximación que se utiliza para obtener la energía rotacional es el modelo del rotor rígido [Bertran, et al., 2000].

La energía vibracional es la que se debe a las vibraciones moleculares, en la que los átomos oscilan alrededor de sus posiciones de equilibrio. Una molécula posee varias formas características de vibrar, que se denominan

modos normales de vibración. La mecánica cuántica muestra que la mínima energía vibracional no es cero, sino que es igual a una cierta cantidad llamada energía vibracional del punto cero, abreviada como ZPVE o ZPE. Esta energía es llamada así porque aún en el cero absoluto de temperaturas (0K) esta presente. En los cálculos termoquímicos del estado basal, la ZPE constituye una corrección a la energía electrónica de la molécula. Regularmente la ZPE debe ser multiplicada previamente por un factor escala determinado empíricamente, para corregir errores sistemáticos en la estimación de la energía de correlación, que conducen a la sobreestimación de la frecuencias vibracionales [Foresman y Frisch, 1996; y Irikura y Frurip, 1997].

La determinación de la energía vibracional se lleva a cabo mediante la aproximación del oscilador armónico, de donde la ZPE de las moléculas es tomada como la mitad de la suma de las frecuencias vibracionales como se muestra en la ecuación (37):

$$ZPE = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \nu_i \quad (36)$$

En la cual: N representa el número de átomos,  $\nu_i$  frecuencias vibracionales fundamentales, las vibraciones son 3N-6 en moléculas no lineales y 3N-5 en lineales [Irikura y Frurip, 1997; y levin, 2004].

En un sistema macroscópico todas las energías son dependientes de la temperatura y presión, a diferencia de la energía electrónica (microscópica). Por ello, los cálculos de frecuencia que incluyen análisis termoquímico del sistema, son efectuados a condiciones estándar: 298.15 K y 1 atmósfera de presión, usando el principal isótopo para cada tipo de elemento presente [Foresman y Frisch, 1996; y Bertran, et al., 2000]. A temperatura ambiente las moléculas poliatómicas poseen cantidades significativas de energía vibracional, por encima de la ZPE, mientras que en el cero absoluto todas las contribuciones a la energía son cero, excepto la correspondiente a la energía vibracional, como se explicó anteriormente [Irikura y Frurip, 1997; y levin, 2004].

Reactividad Química. Dentro de la DFT conceptual, dos conceptos clásicos que están muy ligados a la estructura molecular y a la reactividad química son el potencial químico electrónico y las funciones condensadas de Fukui. Por ello las propiedades de reactividad que se estiman teóricamente, parten de estos dos conceptos. La ecuación básica desarrollada en DFT que representa el cambio químico, a partir del cual se pueden analizar los diversos aspectos de la reactividad química en un sistema molecular, es mostrada a continuación [Andrés y Beltrán, 2000; y Geerlings, et al., 2003]:

$$dE = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{\nu(r)} dN + \int \left( \frac{\partial E}{\partial \nu(r)} \right)_N \delta \nu(r) dr \quad (37)$$

**Potencial químico electrónico ( $\mu$ ).** Matemáticamente se define como la derivada parcial de la energía respecto al número total de electrones, a un potencial externo constante que es ejercido por una determinada posición

nuclear. Indica como cambia la energía al variar el número de electrones y su ecuación es la siguiente [Geerlings, et al., 2003]:

$$\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (38)$$

El potencial químico determinado en DFT, es análogo al potencial químico termodinámico definido por Gibbs para un sistema macroscópico, a una temperatura y presión constantes, como se puede observar al comparar las ecuaciones (37) y (38) [Lewars, 2003]:

$$\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial n} \right)_{T, P} \quad (39)$$

Este potencial químicamente representa la tendencia que tienen los electrones a ser liberados de un sistema, de tal manera, que una diferencia de potencial grande entre dos sistemas favorece la transferencia electrónica. El potencial químico está dado por la afinidad electrónica (A) y el potencial de ionización (I), ya que ambos están involucrados en el proceso de transferencia de electrones entre orbitales [Geerlings, et al., 2003; y Lewars, 2003].

**Afinidad electrónica (A).** Se define como la energía liberada cuando se adiciona un electrón al orbital virtual (LUMO) de una molécula neutra, es decir mide la capacidad de una molécula para aceptar electrones y formar aniones. En un programa computacional se calcula como la diferencia de energía entre la molécula neutra y su anión [Foresman y Frisch, 1996; y Lewars, 2003]:

$$A = E_{(0)} - E_{(-1)} \quad (40)$$

**Potencial de Ionización (I).** Indica la cantidad de energía requerida para remover un electrón del orbital de valencia más altamente ocupado (HOMO) de una molécula, es decir, mide la capacidad de una molécula para donar electrones y formar cationes. Representa la primera energía de ionización, y en un programa computacional se calcula como la diferencia de energía entre la molécula neutra y su catión [Foresman y Frisch, 1996; y Lewars, 2003]:

$$I = E_{(+1)} - E_{(0)} \quad (41)$$

Estas cantidades pueden ser calculadas mediante procedimientos termoquímicos o empleando el teorema de Koopmans. En ambos casos se emplean las mismas fórmulas, la diferencia proviene de donde se estima la energía. [Foresman y Frisch, 1996; y Lewars, 2003].

En el caso de los procedimientos termoquímicos se emplean las energías electrónicas totales de las moléculas neutras y ionizadas, corregidas por la ZPE, mientras que en el teorema de Koopmans se emplean exclusivamente las energías correspondientes a los orbitales de valencia HOMO (alta densidad

electrónica) y LUMO (baja densidad electrónica) de las moléculas neutras y ionizadas. [Foresman y Frisch, 1996; Lewars, 2003; y Geerlings, et al., 2003].

El teorema de Koopmans demuestra que en forma aproximada "la energía necesaria para remover un electrón de una molécula corresponde al valor negativo de la energía del orbital de donde se extrae el electrón". Expresado de otra manera, indica que el negativo de la energía del HOMO es el equivalente al potencial de ionización (I), y opuestamente la energía del LUMO representa la afinidad electrónica (A). Este teorema permite cálculos mas aproximados para potenciales de ionización que para afinidades electrónicas, especialmente de sistemas moleculares grandes. No obstante, de estos procedimientos el más preciso, tanto para I y A es el termoquímico [Foresman y Frisch, 1996; Lewars, 2003; Geerlings, et al., 2003].

Otro factor que tiene efectos directos sobre las variables que definen el potencial químico electrónico, es si la vía de cálculo de las energías es adiabática o vertical [Lewars, 2003].

En las determinaciones teóricas adiabáticas, las energías computarizadas provienen de especies iónicas que poseen geometrías optimizadas en el estado basal, de la misma manera que las especies neutras de las cuales derivan. Mientras que en las determinaciones teóricas verticales, las energías provienen de la misma geometría, es decir, la molécula neutra optimizada a la que se le remueve o adiciona el electrón, no se vuelve a optimizar cuando se convierte en ión. Por esta razón las determinaciones mas precisas y usuales son las adiabáticas [Young, 2001].

A partir del potencial químico se derivan otras variables, íntimamente ligadas entre sí, que constituyen descriptores de reactividad moleculares, entre ellos la electronegatividad.

Electronegatividad ( $\chi$ ). Es una cantidad que emerge como una derivada de primer orden junto con la densidad electrónica a partir de un número determinado de electrones a un potencial fijo. Fundamentalmente el negativo de la electronegatividad es el potencial químico:  $\mu = -\chi$  [Geerlings, et al., 2003].

Desde el punto de vista químico, la electronegatividad representa la tendencia que tienen los átomos o moléculas para atraer los electrones, y para calcularla se utiliza la ecuación propuesta por Mulliken:

$$\chi = \frac{1}{2} (I + A) \quad (42)$$

Donde se puede observar que la electronegatividad al igual que el potencial químico representa el efecto promedio entre la tendencia a atraer y transferir electrones que tienen las moléculas. Mediante su determinación es posible medir el carácter intrínseco de las moléculas como donadoras o aceptoras de electrones [Pearson 1997; Lewars, 2003; y Geerlings, et al., 2003].

Otras variables que se derivan del potencial químico y que son empleados como descriptores de reactividad son la dureza, la blandura y la electrofilicidad.

Dureza ( $\eta$ ). Su definición matemática es la segunda derivada de la energía respecto al número de electrones a un potencial externo constante, y representa la resistencia a la liberación de electrones. La dureza modula la electronegatividad de un átomo, grupo o molécula, de acuerdo a la carga del sistema: incrementando el número de electrones en un sistema decreta su electronegatividad y viceversa [Parr y Pearson, 1983; y Geerlings, et al, 2003]. Se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{1}{2} (I - A) \quad (43)$$

Actualmente existe otra manera de estimar la dureza, en la cual se establece una relación cualitativa inversa de la dureza con la polarizabilidad. En este sentido la nube electrónica de un átomo o molécula es débilmente deformada cuanto mayor es su dureza y menor es la polarizabilidad [Lewars, 2003; y Geerlings, et al, 2003].

Blandura ( $s$ ). Este término significa lo contrario a la dureza, por lo que representa la facilidad con la que se pueden transferir los electrones. Desde el punto de vista de polarizabilidad, existe una relación directa entre ambas, ya que entre mayor blandura posee un átomo, más fácilmente es deformada su nube electrónica y mayor es su polarizabilidad [Lewars, 2003; y Geerlings, et al, 2003]. Su representación es la siguiente:

$$s = \frac{1}{\eta} \quad (44)$$

La dureza y la blandura también pueden ser determinadas a través de la capa de conducción Gap, la cual representa la diferencia de energía entre los orbitales frontera [Pearson, 1997]:

$$\text{Gap} = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}} \quad (45)$$

Un sistema electrónico con un Gap grande posee mayor dureza, es más estable, menos reactivo y por lo mismo su tendencia a oxidarse es menor que un sistema con un Gap pequeño, de acuerdo al principio de máxima dureza [Pearson, 1997].

Electrofilicidad ( $\omega$ ). Este índice de reactividad combina la electronegatividad y la dureza. Mide la máxima transferencia de electrones que se puede dar entre un donador y un aceptor. Mientras la afinidad electrónica indica la capacidad o afinidad que tiene una molécula para aceptar un solo electrón, la electrofilicidad se refiere al máximo número de electrones que puede ser aceptado hasta llegar a la saturación de un ligando. Desde el punto de energético, representa una medida de la estabilización en energía, cuando el sistema adquiere una carga electrónica adicional del medio ambiente [Parr, et al, 1999].



La electrofilicidad es un descriptor de reactividad que permite una clasificación cuantitativa de la naturaleza electrofílica global de una molécula dentro de una escala relativa [Parr, et al, 1999], y se representa como:

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (46)$$

**Funciones Condensadas de Fukui.** Mediante expresiones matemáticas, definen la sensibilidad que tiene un sistema molecular a experimentar cambios en su densidad electrónica, en diferentes puntos de su estructura. En una reacción química, un cambio en el número de electrones involucra la remoción o adición de por lo menos un electrón en los orbitales de valencia o frontera. De tal manera que mediante las funciones de Fukui, es posible determinar los sitios reactivos de una molécula basándose en los cambios de densidad electrónica experimentados por la misma, durante el curso de una reacción. A partir del análisis de Fukui se pueden establecer tres tipos de funciones importantes, que no solo permiten determinar los sitios reactivos, sino también identifican la naturaleza de la reacción, es decir, si es del tipo nucleofílica, electrofílica y/o radical [Foresman y Frisch, 1996; Andrés y Beltrán; y Lewars, 2003]. Las ecuaciones que definen las mencionadas funciones son las siguientes:

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N) \quad (\text{ataque nucleofílico}) \quad (47)$$

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1) \quad (\text{ataque electrofílico}) \quad (48)$$

$$f_k^0 = \frac{q_k(N + 1) - q_k(N - 1)}{2} \quad (\text{ataque radical}) \quad (49)$$

Donde:  $k$  = un átomo  $k$ -ésimo de una molécula  
 $q_k$  = población electrónica del  $k$ -ésimo átomo  
 $N$  = número de electrones

Las funciones condensadas de Fukui son buenos índices de reactividad especialmente en moléculas que poseen un sistema de electrones  $\pi$ , como es el caso de los flavonoides, ya que estos son altamente polarizables, y por lo mismo cuando son sometidos a ataques electrofílicos y nucleofílicos se induce la aparición de cargas efectivas en los sitios reactivos [Foresman y Frisch, 1996; Andrés y Beltrán; y Lewars, 2003].

Para analizar la reactividad de una molécula bajo el esquema de funciones de Fukui, es necesario realizar un análisis de la partición o distribución de la población de cargas dentro de la estructura molecular de interés [Young, 2001].

El análisis poblacional de cargas constituye una ruta matemática que permite la partición de la función de onda o densidad electrónica en fragmentos atómicos, que permiten localizar las distribuciones de la carga electrónica en base a una cierta distancia y posición nuclear, y en relación a los enlaces

establecidos al interactuar con fragmentos vecinos [Young, 2001]. Aunque las cargas son parciales, debido a que representan fracciones de electrones correspondientes a un porcentaje de tiempo en el que pueden permanecer cercanas al núcleo, su asignación permite predecir con bastante proximidad los sitios reactivos. Actualmente se cuenta con cuatro esquemas de análisis alternativos y se citan a continuación [Foresman y Frisch, 1996; Andrés y Beltrán; y Lewars, 2003]:

**Análisis Poblacional de Mulliken (MPA).** Este análisis es sencillo, rápido, económico y de gran utilidad para moléculas no polares y pequeñas. La distribución de cargas la realiza en base a la densidad electrónica localizada en los traslapes de los orbitales moleculares. Constituye un esquema arbitrario, ya que parte de la suposición fundamental de que el traslape entre los orbitales es compartido equitativamente, es decir, no considerar la electronegatividad de los átomos individuales. Por ello tiene como limitante que la distribución de cargas en moléculas que incluyen átomos electronegativos, no es confiable, y su uso no es recomendable para compuestos con carácter iónico [Young, 2001; y Lewars, 2003].

El análisis de Mulliken, es totalmente dependiente de los conjuntos de base empleados, debido a que los traslapes de los orbitales que evalúa son contruidos a partir de las funciones de base. Se ha observado que solo es efectivo para conjuntos de base pequeños, ya que el empleo de conjuntos de base grandes puede dar resultados irrazonables, debido a que las funciones difusas describen átomos adyacentes más que describir al átomo en el cual son centradas [Young, 2001; y Lewars, 2003].

**Análisis Poblacional Natural (NPA o NBO).** Se distingue del análisis de Mulliken, porque en lugar de utilizar directamente los orbitales moleculares, usa los orbitales naturales que representan las eigenfunciones de la matriz de densidad. También se diferencia porque en lugar de buscar los traslapes de los orbitales hace uso de las ocupancias, las cuales se refieren al número de electrones asignados a cada átomo. Este análisis contempla las unidades enlazantes que contienen pares de electrones localizados. Por las razones anteriores, exhibe una estabilidad numérica mejorada y describe mejor la distribución electrónica en compuestos de alto carácter iónico, como aquéllos que contienen átomos metálicos, o bien estructuras carbonadas con grupos OH, como los flavonoides [Reed, et al., 1985].

**Análisis Poblacional de Potencial Electroestático (ESP).** Evalúa la variación del potencial electrostático en una serie de puntos, usualmente la superficie de Van der Waals alrededor de la molécula [Young, 2001]. Prácticamente se busca la formación de cargas parciales sobre el núcleo. Las cargas derivadas de potencial electrostático tienen la ventaja de ser en general, físicamente más satisfactorias que las cargas Mulliken, especialmente cuando se trabajan compuestos con actividad biológica. Este tipo de análisis es relevante en los métodos de mecánica molecular [Souza, et al., 2003].

Análisis poblacional de Hirshfeld (HPA). Mediante este esquema, se lleva a cabo una fina disección molecular para obtener fragmentos atómicos bien definidos. A cada uno de estos fragmentos se les estima la densidad electrónica, la deformación que experimentan sus nubes electrónicas cuando son sometidos a un campo eléctrico, determinándoseles sus momentos dipolares y multipolares, así como el potencial electrostático generado. Los valores obtenidos para los fragmentos, son establecidos en proporción a los valores que se tendrían si los átomos estuvieran libres, y finalmente son sumariados considerando una integración molecular de todos ellos. De tal manera, que al llevar a cabo esta integración se puede establecer la contribución de cada fragmento en los cambios en densidad electrónica, en la deformación de los enlaces, en el potencial electrostático y la transferibilidad de carga neta atómica a nivel molecular. El escalamiento de valores de los fragmentos atómicos a nivel de átomo libre y como molécula integrada, es posible debido al uso de una molécula de referencia a la que se denomina promolécula. [Hirshfeld, 1977].

Propiedades Eléctricas. Mediante la sustitución de diferentes operadores en la ecuación (38) a partir de la cual se analizan los diversos aspectos de la reactividad química, es posible obtener diferentes propiedades, tales como las eléctricas. Estas propiedades determinan la reactividad de los sistemas moleculares en función de la capacidad que poseen para polarizar sus cargas [Young, 2001].

**Momento dipolar.** Representa la primera derivada de la energía con respecto a un campo eléctrico y depende totalmente del momento angular. Es una medida de la asimetría en la distribución de la carga molecular y determina cuando una molécula es polar. Se da como un vector en tres dimensiones y únicamente puede ser calculado en moléculas neutras, ya que en sistemas con carga es dependiente de la selección del origen y la orientación molecular [Foresman y Frish, 1996; Levine, 2004]:

Básicamente el momento dipolar inducido ( $\mu$ ) que resulta de la aplicación de un campo eléctrico tiene cuatro componentes [Foresman y Frish, 1996; y Jensen, 1999]:

$$\mu = \mu_0 + \alpha F + 1/2 \beta F^2 + 1/6 \gamma^3 + \dots \quad (50)$$

$\mu_0$  = momento dipolar permanente

$\alpha$  = polarizabilidad

$\beta$  = hiperpolarizabilidad de primer orden

$\gamma$  = hiperpolarizabilidad de segundo orden

El momento dipolar inducido representa como se redistribuye la carga y la polaridad que adquiere el sistema molecular cuando interacciona con otras

moléculas, en tanto que el momento dipolar permanente revela como se distribuye la carga de la molécula en su estado basal.

**Polarizabilidades.** Las polarizabilidades derivadas del momento dipolar inducido, se definen como la capacidad que tiene un sistema molecular para deformar su nube electrónica frente a un campo eléctrico. En términos de reactividad, se considera que una mayor deformación de la nube electrónica representa mayor facilidad para liberar electrones (oxidarse) y por lo mismo indica una mayor reactividad.

Mientras que la polarizabilidad ( $\alpha$ ) representa los efectos de polarización basados en los electrones de valencia, la hiperpolarizabilidad ( $\beta$ ) indica la contribución que tienen los electrones del centro en la deformación de la nube electrónica [Levine, 2004]. Computacionalmente se determinan de la siguiente manera:

$$\text{Polarizabilidad } (\alpha) \quad \langle \alpha \rangle = 1/3 \{ \alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz} \} \quad (51)$$

$$\text{Hiperpolarizabilidad } (\beta) \quad \beta_{\text{vec}} = 1/5 (\beta_x^2 + \beta_y^2 + \beta_z^2) \quad (52)$$

$$\beta_x = (\beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz}) \quad (53)$$

$$\beta_y = (\beta_{xxy} + \beta_{yyy} + \beta_{yzz}) \quad (54)$$

$$\beta_z = (\beta_{xxz} + \beta_{yyz} + \beta_{zzz}) \quad (55)$$

**Propiedades Magnéticas.** Se obtienen a partir de la primera derivada de la energía con respecto a un campo magnético y al igual que las propiedades eléctricas dependen totalmente del momento angular. El momento dipolar derivado de un campo magnético tiene otras componentes distintas al generado en un campo eléctrico: la segunda derivada es la magnetizabilidad y la correspondiente cantidad macroscópica es la susceptibilidad magnética [Jensen, 1999].

Las sustancias que poseen susceptibilidades magnéticas negativas, son aquéllas que son repelidas por un campo magnético y se conocen como diamagnéticas (moléculas en el estado basal), mientras que las que tienen susceptibilidades magnéticas mayores de cero y son atraídas por un campo magnético se denominan paramagnéticas. En los radicales libres, se observan momentos magnéticos y propiedades paramagnéticas, debido a la presencia de electrones desapareados [Morrison y Boyd, 1998].

Cuando se aplica un campo magnético a un compuesto con un sistema  $\pi$  de electrones, como los flavonoides, los electrones se polarizan y empiezan a circular alrededor del núcleo creando su propio campo magnético que se opone al inducido (ver Figura 1). Este fenómeno se conoce como diamagnetismo y genera efectos de "protección o apantallamiento" característicos de cada átomo, los cuales se relacionan con densidades de carga que influyen en la facilidad con que se puede abstraer un protón o transferir un electrón, y por lo mismo son considerados índices de reactividad [Silverstein y Webster, 1998].

Los efectos de apantallamiento de un átomo son dependientes de tres factores:

1. Efectos inductivos de los grupos vecinos
2. Densidad de electrones circulantes
3. Anisotropía diamagnética

El primer factor es determinado principalmente por la electronegatividad de los sustituyentes, el segundo esta fuertemente enlazado con la deslocalización electrónica y la presencia de puentes de hidrógeno, mientras que el tercero favorece o desfavorece la densidad electrónica dependiendo de la orientación de la molécula respecto a la dirección del campo magnético aplicado [Silverstein y Webster, 1998; y Morrison y Boyd, 1998].

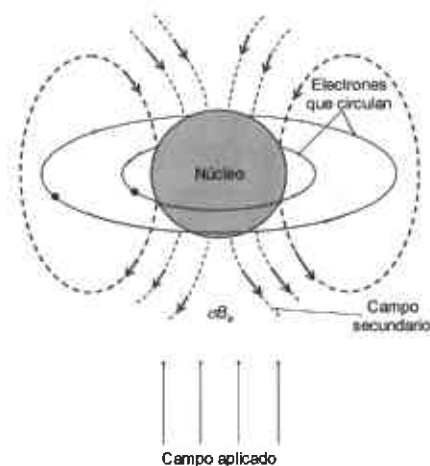


Figura 1. Efectos de apantallamiento diamagnético de los núcleos atómicos

## MATERIALES Y METODOS

### Teoría y Detalles Computacionales

Todos los estudios computacionales se llevaron a cabo empleando los métodos de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), implementados en el paquete computacional GAUSSIAN 03W [Revisión Gaussian 03, 2004]. El funcional de densidad evaluado en este estudio (PBEgPBE) es una modificación de aquellos incorporados en el programa GAUSSIAN 03W y define la nueva química modelo empíricamente desarrollada para sistemas heterocíclicos conocida como CHIH-DFT. La combinación del nuevo funcional con diferentes conjuntos de bases, da origen a tres modelos distintos que se aplican de acuerdo al tamaño molecular, estos son: CHIH(small)-DFT descrita como PBEg/3-21G\*/PBEg/CBSB2\*\* útil para heterociclos grandes; CHIH(medium)-DFT descrita como PBEg/CBSB2\*\*/PBEg/CBSB4 empleada en heterociclos medianos, y CHIH(large)-DFT representada como PBEg/CBSB7//PBEg/CBSB1 aplicable a heterociclos pequeños.

La química modelo particular empleada en este trabajo fue la CHIH(medium)-DFT. El criterio usado para determinar la química modelo más útil, sobre la base de la relación costo-tiempo-presición, fue el número de Funciones Gaussianas Primitivas (FGP) requeridas de acuerdo al tamaño molecular.

El funcional implementado en la química modelo a evaluar, es muy similar al PBE0, pero en este caso el coeficiente que determina el porcentaje de intercambio exacto HF a utilizar no esta predeterminado, sino que depende de la estructura molecular del heterociclo a investigar. Este factor se denomina "g" y se determina mediante la siguiente fórmula empírica:  $g = 0.02 + 0.14 \times \text{FHA} \times \text{FV} + 0.03 \times \text{AHA}$ . Donde FHA es el primer heteroátomo caracterizado por ser el menos electronegativo, FV es el factor de valencia que representa el estado de oxidación de FHA, mientras que AHA se refiere al número adicional de heteroátomos contiguos al FHA. Para las moléculas de quercetina, (+)-catequina y cianidina investigadas en este trabajo, las cuales poseen como único heteroátomo al oxígeno, el factor g se calculó de la siguiente manera:  $g = 0.02 + 0.14 \times 1 \times 1 + 0 = 0.16$ , lo que significa que se trabajó con 16% de intercambio Hartree-Fock y 84% de intercambio PBE [Mendoza y Glossman, 2004; Mendoza y Glossman, 2005; Mendoza y Glossman, 2006].

El modelo fue encontrado por determinaciones a prueba y error de la estructura molecular de varios heterociclos y una comparación con los resultados experimentales. Los coeficientes se fueron ajustando hasta que los valores calculados computacionalmente resultaron iguales a los valores experimentales en los sistemas heterocíclicos estudiados [Glossman, 2006].

Las razones para establecer la dependencia de la mezcla de intercambio HF y DFT con el número de heteroátomos y su estado de oxidación no es aparente, pero la validez de la fórmula empírica ha sido evaluada para diferentes sistemas moleculares [Glossman, 2006].

Los conjuntos de base empleados fueron CBSB2\*\* y CBSB4. El conjunto de base CBSB2\*\* es esencialmente el mismo que 6-31G(d,p), pero con los exponentes de las funciones "d" tomados desde el conjunto de base 6-311G, y también es llamado 6-31G<sup>††</sup> [Foresman y Frisch, 1996; Peterson, et al., 1988; y Petersson y Al-Laham, 1991]. El conjunto de base CBSB4 es igual a 6-31+G(d,p) en H-Si y a 6-31+G(df,p) en P, S y Cl. Los conjuntos de base CBSB2\*\* y CBSB4 son parte del método CBS-QB3 [Montgomery, et al., 1999]. Si se requiere una explicación más detallada de esta nueva química modelo es recomendable consultar las referencias descritas a continuación [Flores y Glossman, 2004; Flores y Glossman, 2005; Flores y Glossman, 2005; Mendoza y Glossman, 2004; Mendoza y Glossman, 2005; Mendoza y Glossman, 2006; Rodriguez y Glossman, 2004; Rodriguez y Glossman, 2005].

Los cálculos realizados en este trabajo fueron:

- Optimización de geometría y frecuencias vibracionales de las cuales se derivaron las propiedades termoquímicas, con el conjunto de base CBSB2\*\*.
- Reactividad química, propiedades eléctricas y magnéticas con el conjunto de base CBSB4. A este grupo de propiedades se les conoce como electrónicas.

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos, la presente investigación se dividió en dos etapas.

### **Etapas I**

En esta primera etapa se determinaron la optimización de geometría, las frecuencias vibracionales y algunas propiedades electrónicas, en las moléculas neutras de los flavonoides seleccionados, tanto en fase de gas como de agua. Otro aspecto de gran relevancia fue establecer los sitios reactivos, verificando la contribución del solvente, ya que a partir de ellos se derivaron los radicales y iones intermediarios estudiados en la etapa II.

Todas las geometrías moleculares fueron optimizadas a través de la técnica incluida por el paquete GAUSSIAN 03W. Las moléculas neutras de quercetina, (+)-catequina y cianidina, fueron modeladas en su conformación no hidratada con los 3-OH y 3'-OH en posición anti, ya que esta conformación es la que ha sido identificada en el plasma humano y tejidos vegetales, y por lo mismo constituye la estructura de nuestro interés. Aún cuando se debe establecer un equilibrio entre las conformaciones anti y syn al permanecer en solución, se ha observado una constante interconversión, en la que la forma predominante es la anti por ser la más estable desde el punto de vista energético [Morrison y Boyd, 1988].

Con la finalidad de lograr una comparación aproximada entre las geometrías determinadas teóricamente y las conformaciones experimentales (fase sólida), la estructura neutra de quercetina también fue modelada en su conformación dihidratada, (+)-catequina fue simulada como tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada y cianidina como bromuro de cianidina monohidratado, ya que estas estructuras, según la bibliografía, son las que muestran las mejores propiedades cristalográficas. Por lo cual son las reportadas en la literatura.

Una vez establecidas la optimizaciones de geometría de las moléculas neutras, se procedió a verificar que los puntos estacionarios fueran mínimos verdaderos, a través de los cálculos de frecuencia. Posteriormente se estimaron las propiedades electrónicas.

Las propiedades electrónicas se clasificaron en globales y locales. Las primeras hacen referencia a las propiedades de la molécula en su totalidad, mientras que las segundas definen las propiedades de cada una de las regiones atómicas de la molécula.

Dentro de las propiedades electrónicas globales, se evaluaron las energías moleculares totales, energías de los orbitales HOMO-LUMO, capa de conducción Gap, propiedades eléctricas, y todos los parámetros que definen y que se derivan del potencial químico (afinidad electrónica, potencial de ionización, electronegatividad, blandura y electrofilicidad). Los parámetros relacionados al potencial químico, fueron establecidos mediante aproximación vertical a partir de las energías moleculares totales. Para la determinación de cada una de estas propiedades se emplearon las ecuaciones descritas en la sección de revisión bibliográfica.

Las propiedades electrónicas locales estudiadas fueron: funciones condensadas de Fukui, análisis de filicidad local y de filicidad grupal. Estas propiedades fueron el punto de partida para el establecimiento de los sitios reactivos.

Las funciones condensadas de Fukui representan un índice de reactividad intramolecular, y por lo tanto una propiedad local, ya que reflejan la reactividad relativa entre los diferentes sitios atómicos, dentro de una molécula [Oláh, et al., 2002]. Las funciones de Fukui, se determinaron empleando los cuatro esquemas básicos de separación de cargas, representados por los análisis poblacionales de: Mulliken (MPA), cargas naturales (NPA), potencial electrostático (ESP) y Hirshfeld (HPA). Las ecuaciones usadas corresponden a los números (48), (49) y (50) de la sección de revisión bibliográfica.

El concepto de "filidadad" local, el cual deriva de multiplicar la electrofilicidad global ( $\omega$ ) por los índices de carga atómica de Fukui, es útil para describir cualitativa y cuantitativamente, los ataques nucleofílicos, electrofílicos y radicales. Tras un estudio detallado, se ha llegado a la conclusión que la electrofilicidad revela mejor las diferencias entre sitios atómicos y entre moléculas, que la suavidad local y el análisis de Fukui. Se ha demostrado que aunque la filicidad local es un descriptor confiable, para reactividad inter e intramolecular, se obtienen resultados más representativos, y menos ambiguos, cuando se suman los efectos ejercidos por un conjunto de átomos relacionados entre sí, a lo que se conoce como "filidadad grupal". Debido a que considera la interacción de múltiples centros atómicos [Parthasarathi, et al., 2004]. En este estudio ambos tipos de filicidad fueron determinados empleando HPA, por ser el esquema de partición de carga más recomendado. Las fórmulas empleadas para su determinación son mostradas a continuación:



$$\omega_k^\alpha = \omega f_k^\alpha \quad (56)$$

$$\omega_g^\alpha = \sum_{K=1}^n \omega_k^\alpha \quad (57)$$

$\omega_k$  = filicidad local

$k$  = cualquier átomo

$\alpha$  = +, -, 0 ataques nucleofílico, electrofílico y radical

$\omega$  = filicidad global

$f_k$  = función de Fukui

$\omega_g$  = filicidad grupal

$n$  = número de átomos coordinados

Caro, et al., (2004), han comprobado la factibilidad de calcular índices de electrofiliidad, bajo efectos de solvente en moléculas orgánicas. Ellos encontraron que las variaciones en relación a la fase de gas, son más notables en los índices globales que en los locales, pero se consideran aplicables.

## Etapa II

La segunda etapa consistió en definir y caracterizar las estructuras de los radicales fenoxilo (semiquinonas), radicales cationes y aniones fenóxido, los cuales fueron derivados a partir de los sitios reactivos establecidos para cada molécula de flavonoide en la etapa I. Con el propósito de conocer el comportamiento de los flavonoides estudiados, al donar el máximo número de electrones posibles ( $2e^-$ ), también fueron analizadas todas las posibles quinonas que se pueden formar a partir de cada uno de ellos. A las moléculas resultantes se les determinaron, su optimización de geometría, frecuencias vibracionales y algunas propiedades electrónicas, con la finalidad de establecer la secuencia de desprotonación y su potencial antioxidante. En este caso, los cálculos se realizaron únicamente en fase acuosa, por ser la de mayor interés.

Las geometrías de iones y radicales fueron optimizadas con la técnica de gradiente al igual que las moléculas neutras, y los puntos estacionarios comprobados mediante cálculos de frecuencia.

Las propiedades electrónicas determinadas fueron: Termoquímicas, RMN y eléctricas.

Propiedades Termoquímicas. Estas propiedades son de gran relevancia en el mecanismo antioxidante, y han constituido una de las principales herramientas empleadas para estudiar la facilidad de formación, y estabilidad de iones y radicales intermediarios. La rapidez con que un radical se puede formar, es medida a través de la energía requerida para desprender un átomo de hidrógeno que forma parte de un enlace covalente. Esta energía es conocida

como entalpía de disociación de enlace o BDE por sus siglas en inglés [Morrison y Boyd, 1998].

Leopoldini, et al., (2004), han comprobado que los valores de BDE en solución y fase de gas no siempre siguen la misma tendencia. En particular algunos compuestos que demuestran ser buenos candidatos para la transferencia de átomos de hidrógeno o electrones en la fase de gas son menos activos en agua. Con ello se reafirma la importancia de determinar las propiedades termoquímicas en solución.

En este estudio, la facilidad de formación de los radicales fenoxilo, fue calculada como la diferencia de entalpía ( $E_e + H_{corr}$ ) entre la molécula neutra (ArOH) y su radical (ArOH $\cdot$ ), después de la remoción del átomo de hidrógeno (BDE), basados en la siguiente reacción:



La facilidad para romper el enlace de hidrógeno heterolíticamente, mediante la transferencia inicial del protón, dando lugar a la formación de un anión fenóxido, también fue estimada como BDE a partir de la presente reacción:



La ecuación general para cálculos de BDE a partir de las reacciones correspondientes, se representa de la siguiente manera [Ochterski, 200]:

$$\Delta_r H^\circ (298 \text{ K}) = \sum (E_e + H_{corr})_{\text{productos}} - \sum (E_e + H_{corr})_{\text{reactantes}} \quad (60)$$

La cantidad de energía requerida para la ruptura heterolítica de un enlace de hidrógeno, donde se transfiere primero el electrón, se midió como potencial de ionización. Actualmente no ha sido establecido ningún mecanismo computacional, a través del cual se pueda determinar específicamente el potencial de ionización para cada una de las funciones fenólicas, de compuestos polifenólicos. El camino convencional para computarizar el IP (ArO $^\cdot$  - ArOH) no permite especificar el IP de cada grupo ionizable, por esta razón en este trabajo se propone un mecanismo basado en las reacciones que se muestran a continuación:



La primera reacción (61) representa la energía requerida para la formación de un radical fenoxilo y es calculada como la diferencia de energía

entre la molécula neutra y el radical formado después de la remoción del átomo de hidrógeno. A través de esta reacción se especifica el grupo OH al cual se determina el IP. La segunda reacción (62), representa la energía requerida para la formación de un biradical catión, y es calculada como la diferencia de energía entre la molécula neutra y el biradical catión obtenido después de remover un electrón desde el radical fenoxilo formado previamente en la reacción (61). En la tercera reacción (63), el resultado de la reacción (61) se resta al resultado de la reacción (62) y el valor obtenido representa el IP adiabático de la función fenólica de interés. La diferencia de energía entre el biradical catión y el radical fenoxilo formados del mismo grupo OH, representan la energía requerida para remover un electrón (IP) de un grupo OH específico en compuestos polifenólicos.

Las tres reacciones anteriores son sumariadas en la siguiente reacción global:



Las especies biradicales se trabajaron con spin singlet debido a que esta es la única forma de asegurar que el programa computacional remueva el electrón del mismo grupo OH o CH al cual previamente se le había removido el átomo de hidrógeno. Por la forma de operar del programa este procedimiento permite especificar el sitio de reacción.

BDE e IP fueron calculadas a las condiciones estándar, 298 K y una atmósfera de presión, con la finalidad de extrapolarlas a las condiciones reales de un sistema macroscópico. Las especies radicales se trabajaron con el sistema a capa abierta (UHF).

#### Sistemas de Referencia

Se emplearon como sistema de referencia algunos compuestos cíclicos equivalentes a los flavonoides, cuyos datos termoquímicos experimentales son conocidos. Entre ellos, fenol y catecol, los cuales se consideran equivalentes del anillo B de los flavonoides, y el resorcinol como equivalente del anillo A.

Al igual que las moléculas de flavonoides, los compuestos cíclicos de referencia fueron optimizados, pero en este caso, con la química modelo análoga, PBE1/CBSB2\*\*, ya que la CHIH(medium)-DFT es exclusiva para sistemas heterocíclicos. La única diferencia entre ambas químicas modelo, es el porcentaje de intercambio HF usado. El funcional PBE1 trabaja con un porcentaje de intercambio constante 25%HF y 75% DFT aplicable a todas las moléculas, mientras que el funcional PBEg lo define individualmente en base al número y tipo de heteroátomos presentes en la molécula.

Las geometrías optimizadas y las frecuencias vibracionales de los compuestos de referencia, también fueron calculadas con el funcional B3LYP y el conjunto de bases CBSB2\*\*, para establecer la precisión del funcional PBEg en relación a B3LYP al mismo nivel de teoría. Como se comentó anteriormente, el funcional B3LYP es el que hasta ahora, ha brindado los resultados más precisos en propiedades termoquímicas dentro de los métodos de DFT.

Con la finalidad de lograr resultados más precisos en las propiedades termoquímicas, se probó un factor escala para ZPE de 0.9750, el cual fue establecido por, Tantirungrotechai, et al., 2006, para la química modelo PBE0/6-31G(d,p). A la par fue empleado un factor escala para ZPE de 0.9470, sugerido por, Wright, et al., 1997, para la química modelo B3LYP/6-31G(d,p).

Propiedades de RMN. Una de las mejores opciones para determinar la susceptibilidad que tiene una molécula a desprotonarse, es medir su pK. En el caso de compuestos que poseen más de un grupo atómico ionizable, como los polifenólicos, esta tarea se complica, especialmente cuando se desea conocer la primera ionización de cada grupo en particular. Entre los métodos experimentales que se conocen actualmente para medir pK (potenciométricos, espectroscopía UV), el único que permite determinar específicamente la primera ionización para cada uno de los grupos ionizables, es la espectroscopia de RMN [Cren, et al., 2002a].

Las determinaciones experimentales de RMN son totalmente dependientes de la temperatura y de los efectos del solvente. Desde que la utilización de solvente puede presentar dificultades, por problemas de solubilidad de los flavonoides, aparte del alto costo de las muestras puras, la utilización de metodologías computacionales representa una excelente alternativa [Sefzik, et al., 2005]. Mediante las metodologías teóricas, el pH no puede ser estrictamente representado. Sin embargo, la simulación de reacciones de desprotonación permiten establecer el pK de los grupos y la secuencia de desprotonación, basadas en la facilidad de la ruptura de los enlaces de hidrógeno y en los cambios químicos originados por cambios de densidad electrónica. Algunas pruebas útiles para ello son las termoquímicas y la RMN, las cuales se complementan, ya que mientras la primera se fundamenta en factores energéticos, la segunda abarca efectos polares, de potencial redox (pK) y de sustitución, considerando cualquier tipo de interacción inter e intramolecular, incluyendo puentes de hidrógeno.

Los cambios químicos originados por cambios en la densidad electrónica, pueden ser medidos como tensores o constantes de apantallamiento ( $\sigma$ ) y son representativos de la estructura electrónica. Por esta razón, pueden ser reproducidos de manera precisa por métodos computacionales, como DFT, que se basan precisamente en la estructura electrónica de los sistemas moleculares. [Sefzik, et al., 2005].

Dentro de los métodos disponibles en el paquete computacional Gaussian-03, para medir constantes de apantallamiento por RMN se encuentra el GIAO, el cual fue utilizado en esta investigación.

El método GIAO (Gaugage-Including Atomic Orbital) ha resultado muy útil y preciso para la determinación de constantes de apantallamiento isotrópicas ( $\sigma_{iso}$ ) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^{17}\text{O}$ . Es efectivo en moléculas con efectos de correlación importante e igualmente aplicable a métodos de DFT pura, de gradiente corregido e híbridos. Esa versatilidad es debida a que las constantes de apantallamiento no son dependientes de los funcionales, sino de las funciones de base empleadas. El campo magnético aplicado es tratado como

una perturbación, por lo que el cálculo de las constantes de apantallamiento, se hace vía las ecuaciones Coupled-Perturbed (CP), permitiendo que los orbitales moleculares construidos sean orientados en la dirección de la perturbación, como respuesta a la aplicación del campo [Cheeseman, et al., 1996]. Empleando esta teoría se evita la necesidad de funciones de base con alto momento angular, permitiendo el uso de conjuntos de bases relativamente pequeños con buena precisión [Wollinski, et al., 1990].

Los tensores que representan las constantes de apantallamiento isotrópicas (misma intensidad en cualquier dirección) de los átomos, fueron medidos automáticamente por el programa, para isótopos de  $^{13}\text{C}$ .

El tensor de apantallamiento es en sí una propiedad electrónica molecular. Para entender lo que representa es necesario recurrir a lo que se conoce como desplazamiento químico [Jameson, 1998].

El desplazamiento químico indica el cambio en la frecuencia de resonancia que experimenta un espín nuclear particular, respecto a un espín de referencia del mismo tipo. El resultado es un tensor de proporcionalidad entre un campo magnético local inducido y un campo externo homogéneo, al cual se le da una magnitud que lo convierte en una cantidad del orden de ppm [Sebastiani, 2003].

Los desplazamientos químicos experimentados por  $^{13}\text{C}$  son relacionados principalmente a hibridación, electronegatividad y posición de los sustituyentes, también reflejan efectos de solvente, la presencia de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, así como la presencia de heteroátomos. Los desplazamientos químicos de los protones unidos a un carbono y cercanos a un grupo funcional son valores promedio ( $\delta$  y  $\tau$ ) diseñados para indicar una región más que un número exacto [Silverstein y Webster, 1998].

El tetrametilsilano (TMS) cuya fórmula es  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ , es utilizado ampliamente como punto de referencia. Por la baja electronegatividad del silicio, el apantallamiento de los protones en el silano es mayor que en la mayoría de las moléculas orgánicas. Como resultado, la mayoría de las señales de RMN aparecen en la misma dirección a partir del TMS. Existen dos escalas usuales para medir los desplazamientos con TMS, una de ellas es " $\delta$ " en la que la posición de la señal de TMS se toma como cero y a partir de ahí se grafican los desplazamientos de las moléculas orgánicas (Fig. 2). Estas se obtienen cuando se resta la  $\sigma_{\text{iso}}$  del carbono de interés, a la  $\sigma_{\text{iso}}$  promedio de los carbonos de TMS. La escala por lo regular se representa de 0 a 10, pero en compuestos orgánicos anda en un rango que va desde 0 a más de 200 ppm, donde los que tienen un valor de  $\delta$  más cercano a cero se consideran protegidos o apantallados y los que están más cercanos o sobrepasan las 200 ppm están desprotegidos o desapantallados [Silverstein y Webster, 1998; y Morrison y Boyd, 1998].

El efecto de apantallamiento representa una barrera ejercida por los electrones más cercanos al núcleo, que debilita la fuerza de atracción del núcleo hacia los electrones que se encuentran más lejanos a él. Por lo que entre más apantallado está un átomo, más fácilmente dona un electrón [Chang y Collage, 2002].

Para determinar las  $\sigma_{\text{iso}}$  de TMS se empleó la química modelo análoga PBE1/CBSB4, después de su optimización con el conjunto de bases CBSB2\*\*.

Con la finalidad de determinar la precisión con la que la química modelo CHIH(medium)-DFT calcula las  $\sigma_{\text{iso}}$  de  $^{13}\text{C}$  y  $\delta$  en relación a datos experimentales reportados en la literatura, se efectuaron optimizaciones y determinaciones de RMN de las moléculas de flavonoides y TMS, simulando como solventes dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), y se compararon con los datos obtenidos en la fase de agua.

Las moléculas de quercetina y (+)-catequina fueron simuladas en su conformación no hidratada anti en todos los solventes empleados, mientras que cianidina en su conformación no hidratada syn para simulación en metanol y no hidratada anti en fase acuosa, con el objetivo de aproximar la simulación teórica con la experimental.

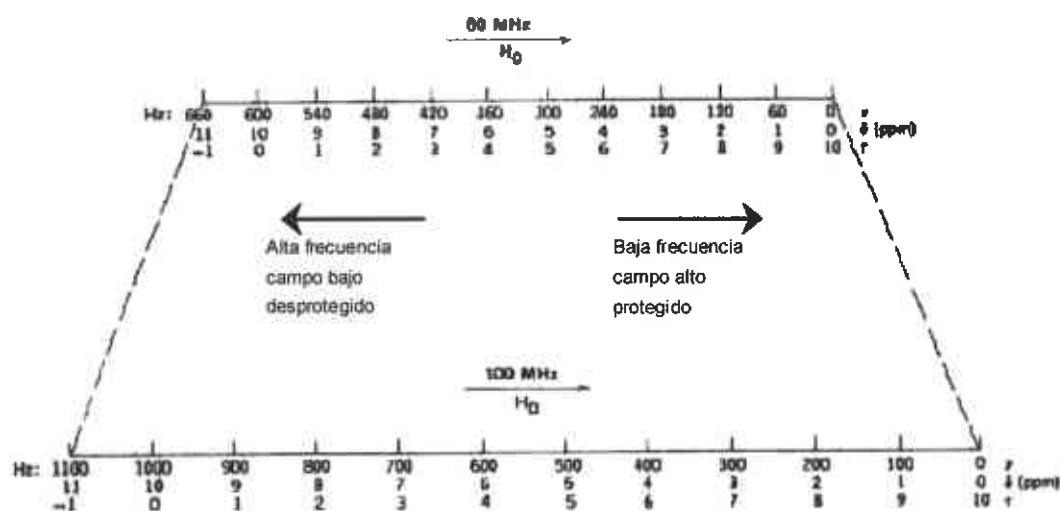


Figura 2. Escala de desplazamientos químicos en relación a TMS

Estabilidad de las Quinonas Formadas Mediante la Transferencia de  $2e^-$ . Para estimar la estabilidad de las quinonas formadas mediante el mecanismo de transferencia de  $2e^-$ , se calcularon las BDE requeridas para la donación del primer átomo de hidrógeno ( $\text{BDE}_1$ ) que da lugar a la formación de una semiquinona o radical fenoxilo, y la transferencia de un segundo átomo de hidrógeno ( $\text{BDE}_2$ ) habiéndose donado el primero. Las BDE fueron calculadas en base a la reacción (59) y ecuación (61) previamente descritas. Así mismo se determinaron la energía molecular total y la energía de la capa de conducción Gap de todas las quinonas formadas en los flavonoides investigados. Las quinonas se formaron tomando en cuenta los grupos OH presentes en las moléculas. Efectuando las combinaciones posible para obtener como máximo dos grupos OH desprotonados.

Propiedades Eléctricas. Las polarizabilidades e hiperpolarizabilidades, se determinaron aplicando las fórmulas descritas en la sección de revisión bibliográfica.

La simulación de los efectos de solvente se realizaron empleando el modelo continuo de conductor polarizable (CPCM) [Barone y Cossi, 1998], implementado en el paquete computacional Gaussian-03W. En el cual el solvente es tratado como un continuo, con una constante dieléctrica uniforme rodeando una molécula de soluto colocada en una cavidad. Las aproximaciones difieren en el tamaño de la cavidad y el campo de reacción empleado. Para ello fue usado un set de solvatación que el programa da automáticamente y se conoce como modelo de átomo unido (UAO). Este contruye la cavidad usando el método topológico de átomos unidos (UATM) y el radio atómico del campo de fuerza universal (UFF) [Ben-Naim y Marcus, 1984].

El método CPCM ha sido probado para simular medios acuosos en reacciones de tipo biológico, donde se emplean moléculas orgánicas neutras e iónicas. Los cálculos han resultado precisos y con bajo costo. Entre las determinaciones efectuadas se encuentran propiedades termoquímicas, como BDE, IP, entalpías de formación, energías de solvatación y filicidad [Takano y Houk, 2004].

Normalmente las esferas o cavidades son centradas sobre los átomos pesados y los hidrógenos incluidas dentro de ellas, pero el uso del radio de campo de de fuerza universal (UFF) permite construir esferas individuales para los hidrógenos, lo cual le da mayor precisión a los cálculos donde los hidrógenos son importantes, como nuestro estudio. La precisión del UFF puede ser atribuida a que trabaja con un conjunto de radios de enlace atómico y ángulos que consideran la hibridación, barreras torsionales y de inversión, así como cargas nucleares [Rappé, et al., 1992]

### Sección Experimental

Esta investigación teórica fue apoyada con algunas determinaciones experimentales de difracción de rayos X, efectuadas por nosotros en las moléculas neutras de los flavonoides estudiados. De los tres flavonoides seleccionados, trabajamos únicamente con quercetina y (+)-catequina debido al alto costo de cianidina.

Las muestras de quercetina y (+)-catequina fueron adquiridas de la compañía Sigma como cristales dihidratados y monohidratados respectivamente, ambos con  $\geq 98\%$  de pureza grado HPLC. Las muestras se utilizaron en su forma comercial, sin previa purificación y recristalización.

Los datos de rayos X para quercetina dihidratada y (+)-catequina monohidratada, fueron generados mediante el empleo de dos difractómetros de policristales. Para quercetina se uso un Philips X'pert con un modo de step de  $0.01^\circ$  en la colección de datos y un procedimiento basado en  $4^\circ < 2\theta < 60^\circ$ , con un tiempo de exposición de 2 segundos por step. La radiación aplicada fue una

Ni-monocromada Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ), y el procesamiento de los datos se llevo a cabo en un software APDW\_4.0g. En (+)-catequina se utilizó un segundo difractómetro cuyo modelo es conocido como Siemens D5000, el cual fue operado en condiciones muy similares al anterior: un modo de step of  $0.01^\circ$  en la colección de datos y un procedimiento basado en  $4^\circ < 2\theta < 60^\circ$ , con un tiempo de exposición de 3 segundos por step. Igualmente la radiación aplicada fue una Ni-monocromada Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ), y el procesamiento de los datos se llevo a cabo en un software DIFFRAC AT V3.3. Todas las mediciones, en ambos difractómetros, se efectuaron a temperatura ambiente y su representación gráfica se realizó con el programa Microsoft Excel 2001.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de la Química Modelo

La selección de la química modelo a utilizar fue basada en el número de Funciones Gaussianas Primitivas (FGP), ya que a partir de ellas es posible establecer la precisión y tiempo de los cálculos, por lo que su utilidad consiste en determinar el nivel teórico con que se debe trabajar. Esta determinación se realizó a las moléculas de quercetina, (+)-catequina y cianidina con los tres modelos químicos desarrollados en nuestro laboratorio: CHIH(small)-DFT, CHIH(medium)-DFT y CHIH(large)-DFT.

De acuerdo al criterio de selección empleado, el número de FGP no debe ser bajo y tampoco exceder de 1,000 para lograr un equilibrio entre tiempo y precisión de los cálculos. En base a ello, el modelo más adecuado para las moléculas de flavonoides a estudiar resultó el CHIH(medium)-DFT, ya que estas requieren entre 665 a 774 FGP para cálculos computacionales con un buen nivel de teoría ajustado a su estructura, como se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Determinación del número de FGP empleadas por los Modelos CHIH(s), CHIH(m) y CHIH(l) en moléculas de flavonoides

Molécula	Conjunto de Base	Número de FGP
Quercetina	CBSB1	1224
	CBSB7	784
	CBSB4	774
	CBSB2**	686
	3-21G*	360
(+) -Catequina	CBSB1	1204
	CBSB7	784
	CBSB4	770
	CBSB2**	686
	3-21G*	357
Cianidina	CBSB1	1180
	CBSB7	760
	CBSB4	749
	CBSB2**	665
	3-21G*	348

## Etapa I

### Optimización de Geometría de las Moléculas Neutras

Comparación de Estructuras Teóricas Optimizadas y Experimentales. Una manera de comprobar que la estructura que se estudia teóricamente corresponde a la conformación experimental de interés, es cotejar las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros de ambas estructuras.

Para la comparación de quercetina (Fig. 3) se emplearon los datos experimentales de difracción de rayos X establecidos por, Yin, et al., (1990), donde la muestra se preparó en forma de monocristal dihidratado con la conformación anti. La Tabla 3 muestra la existencia de una gran similitud entre los valores de las distancias de enlace calculados teórica y experimentalmente, aún considerando las distintas conformaciones y fases comparadas. Esta afirmación se corrobora con los bajos valores de las desviaciones estándar que se pueden observar en la misma tabla.

Las distancias de enlace C-C y C-O teóricas y experimentales presentaron pequeñas diferencias, en el orden de 0.01-0.02 Å; mientras que las distancias de enlace O-H mostraron diferencias más notables en el rango de 0.01-0.08 Å. De acuerdo a la literatura, la distancia del enlace RO-H tiene un valor promedio de 0.97 Å [Dean, 1999], el cual es muy cercano al valor teórico encontrado para cada uno de los grupos hidroxilos estudiados (0.96-1.0 Å) y mas distante del valor experimental (0.91-0.99 Å) determinado en fase sólida. Las grandes diferencias observadas en la fase sólida pueden atribuirse al hecho que los grupos OH constituyen el sitio para interacciones intermoleculares entre varias moléculas de quercetina y también para enlaces de hidrógeno con el agua que forma parte de la red del cristal. De manera opuesta, mediante la simulación computacional es modelada una sola molécula, libre de interacciones intermoleculares, razón por la cual las distancias de enlace teóricas casi no se ven modificadas.

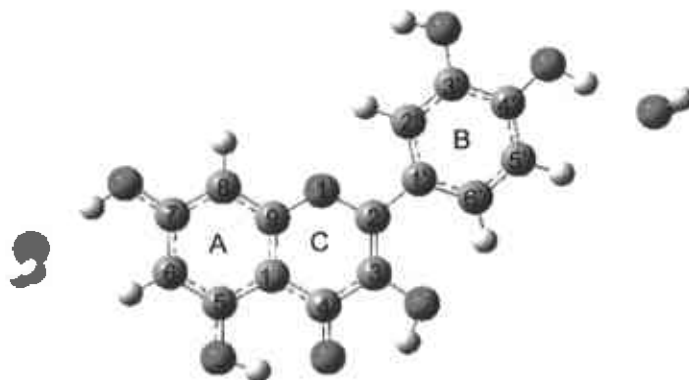


Figura 3. Estructura molecular optimizada de quercetina dihidratada

Tabla 3. Distancias de enlace de las moléculas de quercetina dihidratada y no hidratada en distintas fases

Distancias de enlace Å	Rayos X Sólida	Dihidratada Gas	Dihidratada Agua	No hidratada Gas	No hidratada Agua
C6 - C5	1.37	1.39	1.39	1.39	1.39
C6 - C7	1.40	1.41	1.41	1.41	1.41
C5 - C10	1.42	1.42	1.42	1.42	1.42
C5 - O5	1.35	1.33	1.34	1.33	1.34
C10 - C9	1.39	1.41	1.41	1.41	1.41
C10 - C4	1.42	1.43	1.43	1.43	1.43
C9 - O1	1.37	1.36	1.36	1.36	1.36
C9 - C8	1.38	1.39	1.39	1.39	1.39
C7 - O7	1.36	1.35	1.35	1.35	1.35
C7 - C8	1.39	1.40	1.40	1.40	1.40
C4 - C3	1.43	1.45	1.45	1.45	1.45
C4 - O4	1.27	1.26	1.26	1.26	1.26
C2 - C3	1.35	1.37	1.38	1.37	1.38
C2 - O1	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37
C2 - C1'	1.47	1.46	1.46	1.46	1.46
C3 - O3	1.36	1.35	1.35	1.35	1.35
C1' - C2'	1.40	1.41	1.41	1.41	1.41
C1' - C6'	1.40	1.41	1.41	1.41	1.41
C2' - C3'	1.38	1.39	1.39	1.39	1.39
C6' - C5'	1.38	1.39	1.39	1.39	1.39
C3' - C4'	1.39	1.41	1.42	1.41	1.41
C3' - O3'	1.37	1.36	1.36	1.36	1.36
C5' - C4'	1.38	1.40	1.40	1.39	1.40
C4' - O4'	1.37	1.35	1.35	1.37	1.35
O3 - H3	0.91	0.98	0.99	0.98	0.99
O5 - H5	0.95	1.00	1.00	0.99	1.00
O7 - H7	0.91	0.97	0.99	0.97	0.99
O3' - H3'	0.99	0.97	0.98	0.97	0.98
O4' - H4'	0.98	0.97	0.99	0.96	0.99
	<b>D.S.</b>	<b>0.0240</b>	<b>0.0264</b>	<b>0.0235</b>	<b>0.0262</b>

Como se puede apreciar en la Tabla 4, los ángulos de enlace entre átomos de carbono determinados teórica y experimentalmente, presentaron diferencias cercanas a 1°. La presencia de un átomo de oxígeno desvía los valores experimentales alrededor de 1–3° respecto al ángulo de enlace teórico; mientras la presencia de un grupo OH origina una gran desviación del ángulo en un rango de 4-8°, tal como sucedió con las distancias de enlace. Este comportamiento también es atribuido a las interacciones intermoleculares de los grupos OH en la fase sólida. No obstante las desviaciones estándar entre datos teóricos y experimentales son bajas y denotan un rango de variabilidad dentro de límites aceptables.

Tabla 4. Ángulos de enlace de las moléculas de quercetina dihidratada y no hidratada en distintas fases

Ángulos de enlace	Rayos X Sólida	Dihidratada Gas	Dihidratada Agua	No hidratada Gas	No hidratada Agua
C5 - C6 - C7	119.50	119.68	119.72	119.67	119.74
C6 - C5 - C10	120.80	119.38	119.84	119.37	119.86
C6 - C5 - O5	120.20	120.50	120.34	120.53	120.22
C10 - C5 - O5	119.00	120.12	119.82	120.11	119.92
C5 - C10 - C9	117.40	119.22	118.69	119.22	118.63
C5 - C10 - C4	122.20	121.42	121.73	121.44	121.82
C9 - C10 - C4	120.50	119.36	119.58	119.32	119.55
C10 - C9 - O1	119.70	120.53	120.29	120.54	120.34
C10 - C9 - C8	123.20	121.91	122.25	121.90	122.27
C8 - C9 - O1	117.10	117.57	117.45	117.56	117.40
C6 - C7 - O7	120.30	121.44	121.80	121.40	121.79
C6 - C7 - C8	121.80	122.05	121.63	122.09	121.60
C8 - C7 - O7	117.80	116.51	116.58	116.51	116.61
C10 - C4 - C3	116.70	116.98	116.89	116.98	116.87
C10 - C4 - O4	122.70	124.59	123.77	124.66	123.86
C3 - C4 - O4	120.60	118.43	119.34	118.36	119.27
C3 - C2 - O1	120.10	119.40	119.52	119.41	119.53
C3 - C2 - C1'	128.40	128.16	128.40	128.21	128.40
C1 - C2 - O1	111.50	112.44	112.08	112.37	112.08
C4 - C3 - C2	121.20	121.17	120.99	121.13	121.02
C4 - C3 - O3	117.60	114.40	116.26	114.29	116.18
C2 - C3 - O3	121.10	124.44	122.75	124.58	122.80
C9 - O1 - C2	121.70	122.57	122.71	122.61	122.70
C2 - C1' - C2'	119.70	119.65	119.32	119.36	119.23
C2 - C1' - C6'	121.60	122.01	122.46	121.65	122.34
C2' - C1' - C6'	118.60	118.34	118.22	118.97	118.43
C1' - C2' - C3'	120.70	121.67	121.66	120.87	121.29
C1' - C6' - C5'	120.20	119.94	120.18	120.07	120.27
C2' - C3' - C4'	120.00	119.53	119.58	119.55	119.70
C2' - C3' - O3'	122.20	123.65	123.71	120.14	118.96
C4' - C3' - O3'	117.80	116.82	116.71	120.32	121.34
C6' - C5' - C4'	120.90	121.62	121.49	120.52	121.00
C3' - C4' - C5'	119.50	118.89	118.88	120.02	119.31
C3' - C4' - O4'	117.90	117.17	117.06	125.05	115.78
C9 - C8 - C7	117.30	117.76	117.88	117.74	117.90
C3 - O3 - H3	110.30	102.50	106.03	102.45	106.05
C5 - O5 - H5	101.90	106.23	105.92	106.24	106.05
C7 - O7 - H7	113.20	108.61	110.15	108.61	110.11
C3' - O3' - H3'	112.60	108.03	109.22	106.91	109.74
C4' - O4' - H4'	101.80	108.14	109.32	109.46	110.44
<b>D.S.</b>		<b>2.3430</b>	<b>1.8780</b>	<b>2.7910</b>	<b>2.1240</b>

Los ángulos diedros que se muestran en la Tabla 5, son los que regularmente se utilizan para definir la planaridad de una molécula, por esta razón son los que más variabilidad presentaron en las diferentes conformaciones y fases estudiadas. Sin embargo, los valores definen una clara tendencia en todos los casos a orientarse a 0° o 180°; Ya que quercetina es una molécula plana. Los valores de los ángulos diedros C1-C2-C1'-C2', C1-C2-C1'-C6' y C3-C2-C1'-C6' indican que los tres anillos de la molécula de quercetina están dentro del mismo plano, ya que son cercanos a los 0° y 180°.

Un cálculo realizado adicionalmente por, Jin, et al., 1990, acerca de la barrera rotacional del anillo B en relación al anillo C, demostró que la conformación estable de quercetina posee un ángulo de torsión C3-C2-C1'-C6' cercano a 0° ó 180°, como sucede en las moléculas optimizadas con la química modelo evaluada en este trabajo.

Debido a las interacciones intermoleculares a las que quercetina es sometida en el estado sólido, tiende a adquirir conformaciones que la desvían ligeramente de su planaridad. De acuerdo a la Tabla 5, los ángulos diedros que presentaron las mayores desviaciones son H3'-O3'-C3'-C4' y H5-O5-C5-C6, los cuales se ha comprobado constituyen uno de los sitios más comunes, para enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua que forman parte de la red cristalina.

De manera general los resultados teóricos se apegan a los experimentales, como fue comentado anteriormente las diferencias observadas entre ambos, se fundamentan en las interacciones a las que se someten las moléculas en la fase sólida.

Tabla 5. Ángulos diedros de las moléculas de quercetina dihidratada y no hidratada en distintas fases

Ángulos diedros	Rayos X Sólida	Dihidratada Gas	Dihidratada Agua	No hidratada Gas	No hidratada Agua
C1-C2 -C1' -C2'	6.88	0.18	0.86	0.00	-0.17
C1-C2 -C1' -C6'	175.01	-179.86	-179.13	-180.00	179.82
H3'-O3' -C3' -C4'	165.64 <sup>a</sup>	179.98	179.54	0.00	-0.10
H4' -O4' -C4' -C3'	176.92 <sup>a</sup>	-179.98	-179.60	-180.00	-179.93
H7 -O7 -C7 -C8	175.28 <sup>a</sup>	179.97	179.98	180.00	179.97
H7 -O7 -C7 -C6	17.00 <sup>b</sup>	-0.04	-0.05	0.00	-0.03
H5 -O5 -C5 -C6	152.00 <sup>b</sup>	179.98	180.00	-180.00	179.97
H3 -O3 -C3 -C4	26.00 <sup>b</sup>	0.00	-0.15	0.00	0.12
C3 -C2 -C1' -C2'	171.49	-179.80	-179.08	-180.00	179.84
C3 -C2 -C1' -C6'	6.62	0.16	0.93	0.00	-0.17

En la molécula de (+)-catequina los datos experimentales se basaron en la referencia de, Fronczek, et al., 1993. En este caso no fue posible hacer la comparación directa sino con un derivado: tetra-O-metil-(+)-catequina, debido a que las muestras de (+)-catequina carecen de una estructura cristalina adecuada para el estudio de rayos X. Tal como se puede observar en la Figura 4, donde se ilustra un difractograma generado experimentalmente en nuestro estudio.

El difractograma revela una estructura amorfa, poco cristalina. En parte esto puede deberse a que la muestra se utilizó en las condiciones en que fue adquirida, sin ser recristalizada ni purificada, además que el análisis se efectuó en un difractómetro de rayos X de policristales, lo cual no es lo más adecuado en el caso de estructuras moleculares asimétricas. Sin embargo, en la literatura se ha reportado que aún cuando (+)-catequina ha sido sometida a diferentes procesos de recristalización y monocristalización, los resultados no han sido satisfactorios [Fronczek, et al., 1993]. Actualmente solo se conoce un trabajo realizado por un grupo de investigadores japoneses donde han logrado obtener los datos cristalográficos de este flavonoide en forma anhidra, monohidratada y tetrahidratada, los cuales han sido patentados, debido a la dificultad que implica reproducir estos datos experimentalmente [Tatsuhiko, et al., 1985].

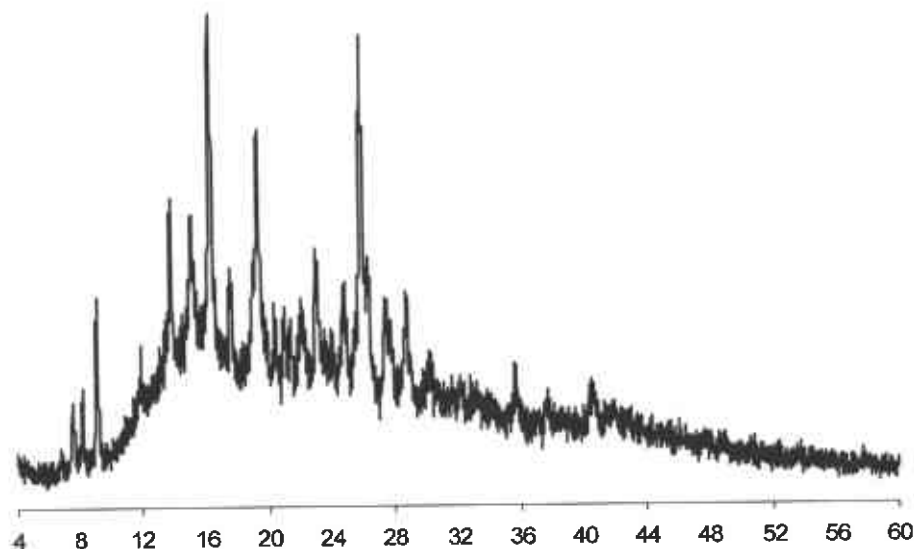


Figura 4. Patrón de Difracción de rayos X de (+)-catequina monohidratada

Para obtener los datos experimentales de las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros de tetra-O-metil-(+)-catequina, se hizo uso del programa Powder Cell para reproducir el difractograma y su estructura molecular, ya que en la referencia consultada solo se reportaron las coordenadas cristalográficas para cada uno de los átomos.

En la Figura 5A, se muestra el cristal reproducido con dos estructuras moleculares de tetra-O-metil-(+)-catequina, a partir de las cuales se calcularon los datos requeridos. Se puede observar que las estructuras están monohidratadas y poseen la conformación anti, además de la posición ecuatorial del anillo B; únicamente varían en el ángulo diedro definido por C2-C3-O3-H3, debido a la diferente orientación del 3-OH. Ambas estructuras se interconvierten rápidamente entre sí.

Aún cuando el interés de este trabajo es estudiar al flavonoide (+)-catequina en su forma no hidratada y conformación anti, también se modeló la molécula de tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada (Fig. 5B), para hacer una comparación lo más aproximada posible con los datos experimentales.

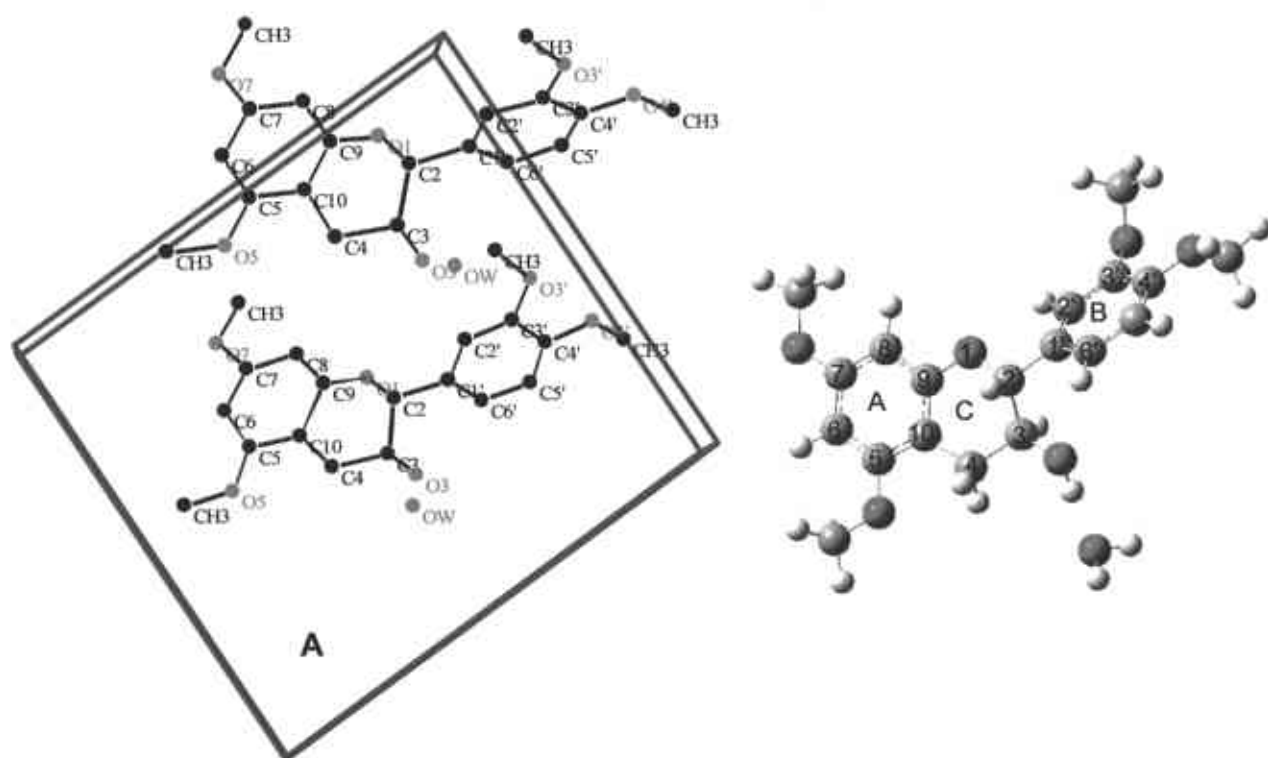


Figura 5. Cristal reproducido de tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada (A), y estructura molecular de tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada optimizada con la química modelo CHIH(medium)-DFT (B).

Al analizar las distancias y ángulos de enlace mostrados en las Tablas 6 y 7 respectivamente, se observan valores muy similares entre la molécula de tetra-O-metil-(+)-catequina simulada y el derivado metilado experimentalmente. Las desviaciones estándar entre valores teóricos y experimentales, realmente son pequeñas. El rango de variación para distancias de enlace fue de 0.0-0.01

Å y para ángulos de enlace de 0.04-1.0°, con excepción de aquéllas distancias y ángulos que involucran átomos relacionados a: grupos metilo, enlace C3-OH3, y el sitio de unión del anillo B con el anillo C. Los grupos metilo presentan interacciones estéricas, las cuales en el estado sólido son notablemente más grandes que en las otras fases, dando lugar a cambios en conformación para lograr la estabilidad molecular. En relación a la posición del OH del C3, existen dos posibles orientaciones que dan lugar a dos isómeros conformacionales. En lo que concierne a la orientación del anillo B respecto al anillo C, en la fase sólida se favorece la posición ecuatorial del anillo B, mientras que en las fases de gas y solución el anillo B adquiere ambas posiciones axial y ecuatorial [Fronczek, et al., 1993]. Estos eventos químicos son totalmente dependientes de la fase de estudio, estableciendo diferencias estructurales entre moléculas simuladas y experimentales.

Tabla 6. Distancias de enlace de las moléculas de tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada y (+)-catequina no hidratada en distintas fases

Distancias de enlace Å	Rayos X	Monohidratada	No hidratada	No hidratada
	Sólida	Gas	Gas	Agua
C2 - C3	1.53	1.54	1.54	1.54
C2 - O1	1.45	1.43	1.43	1.44
C2 - C1'	1.51	1.51	1.51	1.51
C9 - C10	1.41	1.40	1.40	1.40
C8 - C9	1.40	1.40	1.40	1.40
C9 - O1	1.35	1.36	1.36	1.37
C4 - C10	1.50	1.50	1.50	1.50
C5 - C10	1.40	1.41	1.40	1.41
C3 - C4	1.52	1.53	1.53	1.53
C3 - O3	1.42	1.41	1.42	1.41
C7 - C8	1.39	1.39	1.39	1.40
C5 - C6	1.40	1.40	1.40	1.40
C5 - O5	1.35	1.36	1.36	1.36
C6 - C7	1.39	1.40	1.40	1.40
C7 - O7	1.38	1.36	1.36	1.36
C1' - C6'	1.38	1.39	1.40	1.40
C1' - C2'	1.40	1.40	1.40	1.40
C5' - C6'	1.39	1.40	1.40	1.40
C2' - C3'	1.39	1.39	1.39	1.39
C4' - C5'	1.38	1.40	1.39	1.39
C3' - C4'	1.41	1.41	1.41	1.41
C3' - O3'	1.37	1.37	1.36	1.36
C4' - O4'	1.37	1.36	1.37	1.36
O3' - CH <sub>3</sub> 3'	1.42	1.42	0.97	0.98
O4' - CH <sub>3</sub> 4'	1.42	1.41	0.96	0.98
O5 - CH <sub>3</sub> 5	1.42	1.41	0.96	0.98
O7 - CH <sub>3</sub> 7	1.42	1.41	0.96	0.98
	D.S.	0.0100	0.1786	0.1719



En comparación a la molécula de (+)-catequina, el derivado metilado experimentalmente, presenta grandes variaciones en distancias y ángulos de enlace solo en los sitios donde los hidrógenos de los grupos hidroxilos se sustituyeron por metilos, en el resto de los átomos los valores permanecen casi sin variar.

Tabla 7. Ángulos de enlace de las moléculas de tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada y (+)-catequina no hidratada en distintas fases

Ángulos de enlace	Rayos X	Monohidratada	No hidratada	No hidratada
	Sólida	Gas	Gas	Agua
O1-C2-C3	103.00	110.44	110.03	109.61
O1-C9-C8	119.54	115.03	115.62	115.64
O1-C9-C10	117.58	122.62	122.24	122.13
C3-C2-O1	109.17	110.44	110.03	109.60
C3-C2-C1'	115.88	113.11	113.24	113.71
O1-C2-C1'	106.17	107.61	107.67	107.47
C9-C10-C5	111.39	117.32	117.34	117.32
C4-C10-C5	119.48	121.85	121.76	121.70
C3-C4-C10	110.32	111.41	110.99	111.10
C2-C3-C4	108.91	109.45	109.46	109.07
C2-C3-O3	107.64	107.50	106.93	107.34
C4-C3-O3	111.17	111.55	111.60	111.85
C9-C8-C7	117.87	118.67	119.02	119.01
C10-C5-C6	121.45	121.79	121.81	121.68
C10-C5-O5	117.59	114.52	116.22	116.21
C5-C6-C7	119.67	119.08	119.15	119.34
C8-C7-C6	121.55	120.80	120.55	120.42
C8-C7-O7	123.80	124.32	117.39	117.29
C2-C1'-C6'	122.07	120.29	119.90	120.29
C2-C1'-C2'	119.15	121.13	120.46	120.49
C6'-C1'-C2'	119.04	118.56	119.61	119.20
C1'-C6'-C5'	120.17	120.91	120.25	120.39
C1'-C2'-C3'	121.19	121.31	120.46	120.83
C6'-C5'-C4'	120.80	120.41	119.95	120.38
C2'-C3'-C4'	119.50	119.80	119.52	119.64
C2'-C3'-O3'	124.63	118.83	120.24	119.11
C4'-C3'-3'	115.87	121.30	120.23	121.26
C5'-C4'-C3'	119.23	119.00	120.20	119.55
C5'-C4'-4'	125.03	124.82	124.90	124.80
C3'-C4'-O4'	115.73	116.17	114.90	115.66
C3'-O3'-CH <sub>3</sub> 3'	116.86	114.85	106.61	109.41
C4'-O4'-CH <sub>3</sub> 4'	117.03	117.32	109.11	110.09
C5-O5-CH <sub>3</sub> 5	118.65	117.55	108.37	109.53
C7-O7-CH <sub>3</sub> 7	117.32	117.28	108.40	109.52
	<b>D.S.</b>	<b>2.7143</b>	<b>4.2111</b>	<b>3.8419</b>

Los ángulos diedros resultaron en su mayoría bastante comparables entre sí, en las moléculas simuladas (metilada y no metiladas) y el derivado experimental. Las diferencias notables únicamente se observaron en los ángulos que definen la posición del anillo B respecto al anillo C (C3-C2-C1'-C2', O1-C2-C1'-C6' y O1-C2-C1'-C2') por variaciones en las fases de estudio, como se puede corroborar en la Tabla 8. Los valores de estos ángulos sugieren una estructura no planar para tetra-O-metil-(+)-catequina y (+)-catequina.

Un cálculo complementario realizado por, Fronczek, et al., 1993, demostró que la barrera rotacional del ángulo diedro C2-C3-O3-H3 revela una estructura estable cuando se toman valores de -83 a -63° ó bien 180°. Mientras que para el ángulo diedro O1-C2-C1'-C6', entre los anillos C y B, la estructura adopta una conformación estable con valores cercanos a los 140° ó 0 y 180°. Como se puede visualizar en la Tabla 8, las moléculas de tetra-O-metil-(+)-catequina y (+)-catequina optimizadas con la química modelo evaluada en este estudio, se aproximan a dichos valores, lo cual indica que ambas moléculas se encuentran dentro de sus valores mínimos de energía.

Los datos presentados anteriormente sugieren que las diferencias encontradas entre datos teóricos y experimentales, son debidas a las distintas fases en que fueron estudiadas las moléculas y que el método computacional empleado es capaz de revelar las diferencias y reproducir las semejanzas.

Tabla 8. Ángulos diedros de las moléculas de tetra-O-metil-(+)-catequina monohidratada y (+)-catequina no hidratada en distintas fases

Ángulos diedros	Rayos X Sólida	Monohidratada	No hidratada	No hidratada
		Gas	Gas	Agua
C3 -C2 -C1' -C2'	133.82	94.63	90.50	78.71
O1 -C2 -C1' -C6'	72.67	154.06	150.53	138.84
O1 -C2 -C1' -C2'	105.00	-27.63	-31.37	-42.78
C2 -C3 -O3 -H3	179.31	-172.37	179.78	-179.04
C4 -C3 -O3 -H3	61.49	67.63	60.10	61.35
C10 -C5 -O5 -CH <sub>5</sub>	178.01	-178.28	-177.64	-177.81
C8 -C7 -O7 -CH <sub>7</sub>	0.04	0.41	-179.53	-178.35
C6 -C7 -O7 -CH <sub>7</sub>	178.81	180.00	0.08	1.29
C4' -C3' -O3' -CH <sub>3</sub> '	171.06	-170.14	-0.36	-0.15
C5' -C4' -O4' -CH <sub>3</sub> '	2.94	0.424	-0.13	0.55
C3' -C4' -O4' -CH <sub>3</sub> '	178.00	-179.26	179.56	-179.81

Los datos experimentales de la estructura de cianidina corresponden a una de sus formas cristalinas más estables: bromuro de cianidina monohidratado en conformación anti, los cuales fueron reportados por, Ueno y Saito, 1977. Para lograr una mejor aproximación entre datos teóricos y experimentales, esta molécula fue simulada (Fig. 6).

Cabe señalar, que para obtener los datos correspondientes a los ángulos diedros experimentales, se reprodujo la estructura cristalina mediante el

programa Powder Cell, a través de las coordenadas cristalográficas de cada átomo.

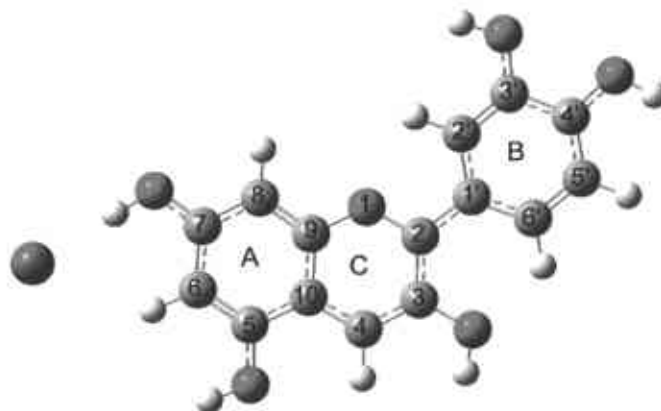


Figura 6. Estructura molecular optimizada del bromuro monohidratado de Cianidina.

Las distancias de enlace, ángulos de enlace y diedros, determinados experimental y teóricamente son mostrados en las Tablas 9, 10 y 11, respectivamente. Las diferencias teóricas y experimentales en las distancias de los enlaces C-C y C-O son pequeñas, debido a que presentan una variación de 0.0-0.02 Å; sin embargo, el rango de variación para las distancias de los enlaces OH es considerado grande, ya que oscila entre 0.05-0.19 Å. Los valores en los ángulos de enlace teórico y experimental son muy cercanos, la máxima variación fue de 1°, aún para aquellos ángulos que incluyen átomos de oxígeno. La excepción son los grupos OH, debido a que ellos originan las mayores diferencias en ángulos de enlace desde 0.5 hasta 2.0°. La mayor desviación absoluta (5.0°) se observó en el 3-OH, el cual constituye el sitio preferencial para interacciones intermoleculares con agua y otras moléculas de cianidina.

En términos generales, la semejanza entre los resultados teóricos y experimentales para distancias de enlace y ángulos de enlace es considerable, y por lo mismo las desviaciones estándar muy pequeñas. Los ángulos diedros tienden a orientarse a 0° o 180°, lo cual confirma la estructura plana de cianidina.

Como lo indicara, DiLabio, et al., (1999), las geometrías optimizadas teóricamente que resultan muy cercanas a la conformación experimental análoga, muestran diferencias en distancias de enlace  $\leq 0.01$  Å y en ángulos de enlace  $\leq 1^\circ$ . Las pequeñas diferencias encontradas en este estudio están dentro del rango citado anteriormente, en tanto que las grandes diferencias son justificadas por las interacciones intermoleculares de los grupos OH en la fase sólida, lo cual a su vez es apoyado por las pequeñas desviaciones estándar encontradas. Basados en ello, se establece que la química modelo

CHIH(medium)-DFT es una buena herramienta computacional, capaz de revelar las diferencias, y precisa para reproducir las propiedades estructurales de mínima energía en compuestos flavonoides.

Tabla 9. Distancias de enlace de las moléculas de bromuro de cianidina monohidratado y cianidina no hidratada en distintas fases

Distancias de enlace Å	Rayos X	Monohidratada	No hidratada	No hidratada
	Sólida	Gas	Gas	Agua
C6 - C5	1.37	1.38	1.38	1.38
C6 - C7	1.42	1.42	1.42	1.42
C6 - H6	0.93	1.09	1.10	1.10
C5 - C10	1.43	1.44	1.43	1.43
C5 - O5	1.34	1.34	1.34	1.34
C10 - C9	1.41	1.42	1.41	1.42
C10 - C4	1.38	1.39	1.40	1.40
C9 - C8	1.38	1.38	1.38	1.39
C9 - O1	1.36	1.36	1.36	1.35
C8 - C7	1.39	1.41	1.40	1.40
C8 - H8	1.09	1.09	1.09	1.09
C7 - O7	1.33	1.31	1.34	1.34
C4 - H4	0.96	1.09	1.09	1.10
C4 - C3	1.38	1.39	1.39	1.39
C2 - C3	1.40	1.42	1.42	1.42
C2 - O1	1.35	1.35	1.34	1.34
C2 - C1'	1.45	1.44	1.44	1.45
C3 - O3	1.35	1.35	1.35	1.34
C1' - C6'	1.40	1.42	1.41	1.41
C1' - C2'	1.41	1.42	1.42	1.42
C6' - C5'	1.38	1.38	1.39	1.39
C6' - H6'	0.97	1.08	1.08	1.08
C2' - C3'	1.37	1.38	1.38	1.38
C2' - H2'	0.97	1.09	1.09	1.09
C5' - C4'	1.38	1.40	1.40	1.40
C5' - H5'	1.00	1.09	1.09	1.09
C3' - C4'	1.40	1.43	1.42	1.42
C3' - O3'	1.35	1.34	1.34	1.35
C4' - O4'	1.35	1.33	1.35	1.34
O3' - H3'	1.02	0.97	0.97	0.98
O4' - H4'	0.82	0.97	0.97	0.99
O3 - H3	0.91	0.97	0.97	0.99
O5 - H5	0.78	0.97	0.99	0.99
O7 - H7	0.88	1.00	0.97	0.99
	D.S.	0.0698	0.0705	0.0734

Tabla 10. Ángulos de enlace de las moléculas de bromuro de cianidina monohidratado y cianidina no hidratada en distintas fases

Ángulos de enlace	Rayos X Sólida	Monohidratada	No hidratada	No hidratada
		Gas	Gas	Agua
C5 -C6 -C7	119.82	120.13	120.04	120.58
C5 -C6 -H6	121.90	121.15	120.04	119.94
C7 -C6 -H6	118.25	118.72	119.61	119.48
C6 -C5 -C10	120.10	120.14	119.74	119.55
C6 -C5 -O5	125.08	124.84	124.70	124.49
C10 -C5 -O5	114.80	115.03	115.56	115.96
C5 -C10 -C9	117.10	117.71	117.69	117.61
C5 -C10 -C4	124.51	124.04	124.31	124.37
C9 -C10 -C4	118.40	118.24	118.00	118.02
C10 -C9 -C8	124.06	123.18	123.55	123.68
C10 -C9 -O1	118.63	118.55	118.60	118.59
C8 -C9 -O1	118.60	118.28	117.85	117.73
C9 -C8 -C7	116.70	117.77	117.28	117.16
C6 -C7 -O7	121.10	122.48	122.06	121.70
C8 -C7 -O7	116.65	116.45	116.55	116.88
C10 -C4 -H4	118.32	118.86	118.69	119.75
H4 -C4 -C3	120.28	119.91	119.94	118.80
C3 -C2 -O1	118.45	117.62	117.58	118.05
C3 -C2 -C1'	129.20	128.97	129.11	128.89
O1 -C2 -C1'	112.40	113.41	113.32	113.06
C4 -C3 -O3	122.40	122.21	122.60	122.65
C2 -C3 -O3	118.10	118.47	118.19	118.51
C9 -O1 -C2	123.63	125.05	125.26	125.05
C2 -C1' -C6'	121.80	122.53	122.46	122.62
C2 -C1' -C2'	119.40	118.93	118.60	118.77
C6' -C1' -C2'	118.84	118.54	118.95	118.61
C1' -C6' -C5'	119.93	120.23	120.08	120.15
C1' -C6' -H6'	118.00	120.56	120.67	120.67
C3' -C2' -H2'	117.64	118.89	117.77	117.75
C6' -C5' -C4'	120.91	121.07	120.42	120.90
C6' -C5' -H5'	119.00	119.77	119.88	120.24
C4' -C5' -H5'	119.00	119.16	119.70	118.86
C2' -C3' -C4'	120.37	119.25	119.19	119.43
C2' -C3' -O3'	124.90	125.20	120.16	119.19
C4' -C3' -O3'	114.73	115.55	120.65	121.38
C5' -C4' -C3'	119.56	119.47	120.38	119.67
C5' -C4' -O4'	124.23	124.36	125.18	124.77
C3' -C4' -O4'	116.21	116.16	114.44	115.56
C3' -O3' -H3'	115.00	110.04	108.48	110.36
C4' -O4' -H4'	112.00	110.37	111.22	111.05
C3 -O3 -H3	110.00	109.99	109.72	110.31
C5 -O5 -H5	109.76	110.32	110.53	110.59
C7 -O7 -H7	110.10	112.59	110.78	110.71
	<b>D.S.</b>	<b>1.1485</b>	<b>1.7659</b>	<b>1.7514</b>

Tabla 11. Ángulos diedros de las moléculas de bromuro de cianidina monohidratado y cianidina no hidratada en distintas fases

Ángulos diedros	Rayos X Sólida	Monohidratada Gas	No hidratada Gas	No hidratada Agua
H6 -C6 -C5 -O5	3.24	-0.02	-0.01	-0.02
C6 -C5 -O5 -H5	13.35	0.01	-0.05	-0.04
C10 -C5 -O5 -H5	168.26	180.00	179.98	179.96
C6 -C7 -O7 -H7	6.44	-0.12	-0.01	-0.06
C8 -C7 -O7 -H7	175.88	179.88	180.01	179.94
H4 -C4 -C3 -C2	175.43	179.98	-179.94	-179.96
H4 -C4 -C3 -O3	20.40	-0.02	0.018	-0.02
O1 -C2 -C3 -C4	2.14	0.03	-0.015	0.01
O1 -C2 -C1' -C6'	167.17	-179.94	-179.57	-179.28
C2 -C3 -O3 -H3	171.52	179.94	179.99	-179.98
C1' -C2' -C3' -O3'	177.82	-179.99	-179.97	-179.93
H2' -C2' -C3' -O3'	2.73	0.04	0.01	0.01
C6' -C5' -C4' -O4'	177.83	-179.98	179.98	-179.97
O3' -C3' -C4' -O4'	0.49	-0.02	-0.02	-0.07

Efectos del Uso de Solvente en las Estructuras Teóricas Optimizadas. Una vez establecidas las diferencias entre las estructuras teóricas optimizadas y las experimentales, se procedió a comparar las variaciones de las estructuras teóricas por efecto del cambio de fase de gas a solución. La determinación en fase de gas fue con el fin de conocer las propiedades intrínsecas de los flavonoides, libre de interacciones moleculares. Mientras la determinación en fase acuosa se hizo con el propósito de simular las condiciones fisiológicas de los organismos vivos, a la vez de investigar las variaciones que se producen en la estabilidad de las estructuras y propiedades moleculares de los flavonoides, por efecto de las interacciones con moléculas de solvente.

Se encontró que la simulación de agua como solvente, no produce alteraciones significativas sobre la estructura de interés (conformación anti no hidratada) de los flavonoides estudiados. Las distancias de enlace más afectadas, en todos los casos, fueron las correspondientes a los puentes de hidrógeno intramoleculares. El rango de variación entre ambas fases, incluyendo todas las moléculas, fue de 0.007- 0.132 Å, donde la máxima diferencia correspondió a quercetina (ver Figuras 7A, 7B y 7C). El hecho de que las distancias de los puentes de hidrógeno hayan dado un pequeño incremento en la fase acuosa, indica que los puentes de hidrógeno intramoleculares de los flavonoides son debilitados, aunque ligeramente, por las interacciones con agua. Los ángulos de enlace y diedros resultaron muy similares, con la excepción del ángulo diedro C1-C2-C1'-C2' de (+)-catequina, el cual varió de -31.37° a -42.48° en fases de gas y agua respectivamente. Indicando que la

interacción con moléculas de agua ocasiona un mayor distanciamiento del anillo B respecto a A y C, lo cual conlleva a una estructura de menor planaridad en la fase acuosa.

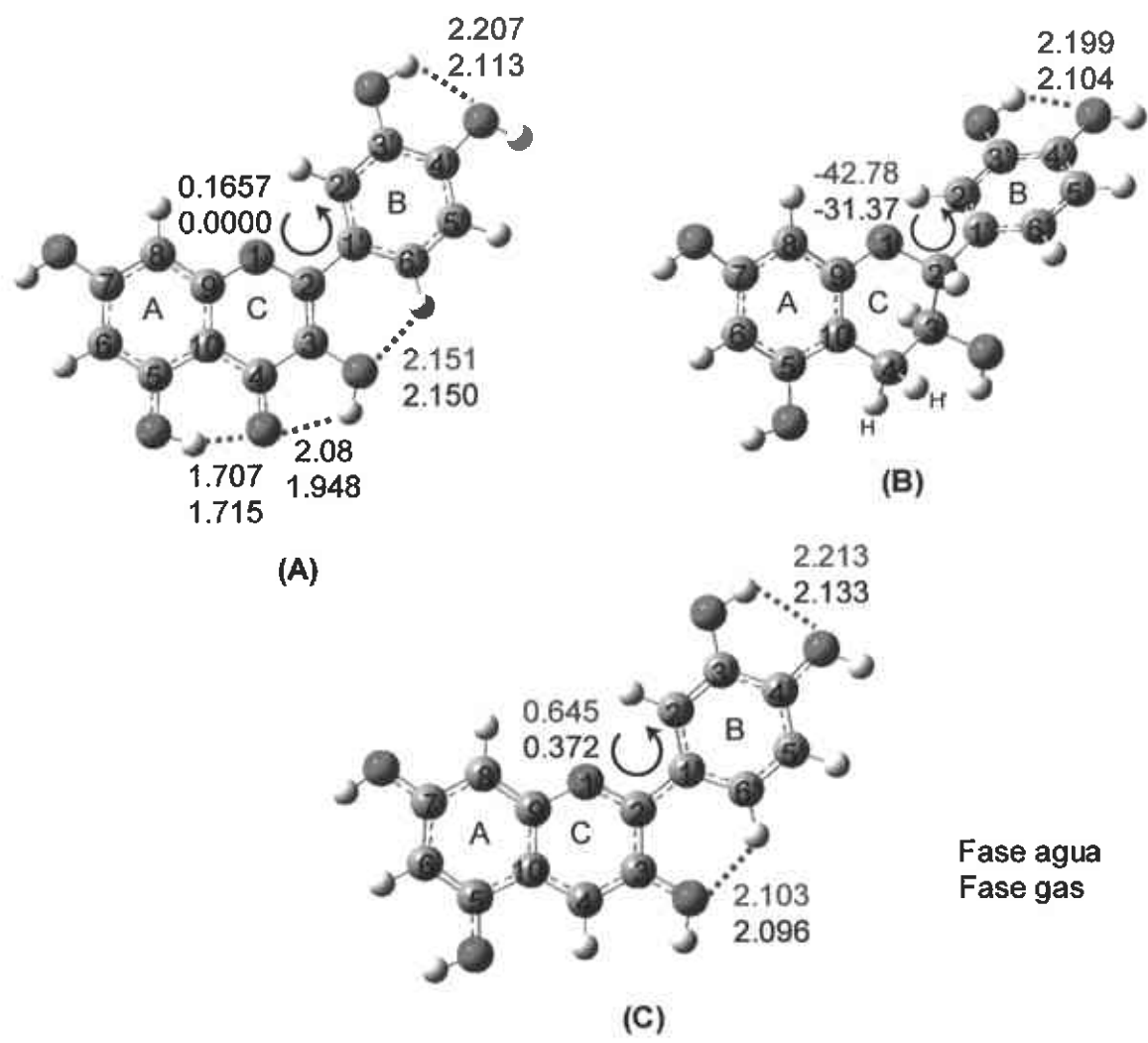


Figura 7. Estructuras moleculares no hidratadas optimizada en fases de gas y agua de quercetina (A), (+)-catequina (B) y cianidina (C).

**Propiedades Electrónicas de las Moléculas Neutras**

Propiedades de Energía, Eléctricas y de Potencial Químico. Las variables mostradas en la Tabla 12, representan propiedades globales, e indican que la presencia de agua como solvente, produce un ligero efecto de estabilización en los flavonoides, desde el punto de vista energético. Debido a que los valores de

energías moleculares totales, tuvieron valores más negativos en la fase acuosa que en la de gas. Las energías de los orbitales HOMO y LUMO presentaron variaciones muy pequeñas entre la fase de gas y agua en las moléculas de quercetina y (+)-catequina, mientras que en cianidina las diferencias fueron notables. Sin embargo, la capa de conducción Gap, casi no varió entre una fase y otra, en todos los casos. De acuerdo a su bajo valor de Gap, cianidina perfila para ser más reactiva que los restantes flavonoides.

Tabla 12. Propiedades electrónicas de las moléculas neutras de quercetina, (+)-catequina y cianidina en fases de gas y agua

Propiedades	Quercetina		(+)-Catequina		Cianidina	
	Fase					
	Acuosa	Gas	Acuosa	Gas	Acuosa	Gas
<b><u>Energía (eV)</u></b>						
Molécula neutra	-30016.87	-30015.70	-28036.69	-28035.12	-27983.25	-27980.12
HOMO	-5.58	-5.69	-5.73	-5.63	-5.96	-9.05
LUMO	-2.26	-2.31	-0.496	-0.38	-3.39	-6.59
Gap	3.32	3.38	5.23	5.25	2.57	2.46
<b><u>Eléctricas</u></b>						
Momento dipolar (Debyes)	4.6332	2.8551	4.4259	3.3356	18.2095	19.5208
Polarizabilidad (au)	343.14	233.99	284.27	203.17	396.78	260.37
Hiperpolarizabilidad (au)	2360.96	726.68	335.09	170.74	4228.95	1051.12
<b><u>Potencial químico (eV)</u></b>						
Afinidad Electrónica	2.35	0.76	0.62	0.40	3.50	5.07
Potencial de Ionización	5.51	7.22	5.68	7.20	5.90	10.57
Blandura	0.63	0.31	0.40	0.26	0.83	0.36
Electronegatividad	3.93	3.99	3.15	3.40	4.70	7.82
Electrofilicidad	4.89	2.47	1.96	1.52	9.20	11.16

Como era de esperarse, las propiedades eléctricas de los flavonoides fueron potenciadas por la polaridad del agua simulada. Los momentos dipolares y polarizabilidades se vieron incrementados en todas las moléculas (Tabla 12). La única excepción se dio en el momento dipolar de cianidina, el cual a pesar de



ser muy alto disminuyó ligeramente en la fase acuosa, hecho que se atribuye a los efectos de atracción y repulsión con el solvente por la carga positiva presente en su estructura. También puede atribuirse a que el potencial ejercido por el solvente, tiende a igualar al que se ejercería a un pH neutro, bajo el cual incrementa la capacidad de cianidina para desprotonarse y formar aniones quinoides como lo indicaran, Kahkonen y Heinonen, 2003. No obstante los resultados anteriores, el más polar de los flavonoides estudiados es cianidina y el menos polar es (+)-catequina. Este hecho es corroborado por los valores de polarizabilidad e hiperpolarizabilidad encontrados.

Aún cuando los tres flavonoides presentaron valores de polarizabilidad dentro de un rango de variación (200 - 400 au), que indica que sus electrones de valencia tienen tendencias comparables para polarizarse, la variación en los valores de hiperpolarizabilidad (170.74 - 4228.95 au) mostraron que la contribución de los electrones de las capas centrales, marcan una gran diferencia en la respuesta de polarización total en cada molécula. Dichas variaciones son atribuidas a los diversos grupos funcionales presentes en cada compuesto, y a la diferente fuerza de atracción que ejerce el núcleo sobre los electrones. Es conocido que entre menor atracción ejerza el núcleo sobre los electrones, mayor será la polarizabilidad e hiperpolarizabilidad [Levine, 2004].

Por otra parte, las variables que definen y que se derivan del potencial químico (Tabla 12), indican de manera global, la tendencia que tiene una molécula a donar o aceptar electrones, por lo que evalúan de una manera general su potencial antioxidante.

Las afinidades electrónicas determinadas en fase de gas, revelaron que las moléculas de quercetina y (+)-catequina tienen una baja tendencia por los electrones (0.76 y 0.40 eV respectivamente); mientras que la molécula de cianidina demuestra una mayor afinidad por ellos (5.07 eV), lo cual se explica por la presencia de una carga positiva en su estructura.

La aplicación de solvente, ocasionó que las afinidades electrónicas tendieran a aumentar en quercetina y (+)-catequina por efecto de la polaridad del agua. Este suceso fue más notable en quercetina y se atribuye a la presencia del grupo ceto, debido a que es altamente polarizable y hace más susceptible a la molécula para un ataque nucleofílico, lo que incrementa su afinidad por los electrones. Opuestamente, la afinidad electrónica de cianidina disminuyó considerablemente desde 5.07 eV en la fase de gas a 3.5 eV en la fase acuosa, probablemente por su tendencia a formar aniones en un potencial cercano al de un pH neutro como el del agua pura. Corroborándose con ello, la influencia que ejerce el solvente sobre la estructura y propiedades antioxidantes.

Los potenciales de ionización disminuyeron en todas las moléculas al cambiar de la fase de gas a la acuosa. Lo que indica que la capacidad de donar electrones, y por lo tanto el potencial antioxidante, se favorece por la presencia de agua. El cambio fue más apreciable en cianidina; sin embargo los potenciales de ionización alcanzados finalmente por los tres flavonoides en agua fueron muy similares entre sí (5.51, 5.68 y 5.90 eV). El valor más bajo correspondió a quercetina y el más alto a cianidina, lo que sugiere un mejor potencial antioxidante para quercetina.

La blandura incrementó con el cambio de fase en todos los casos. El mayor incremento fue observado en cianidina, poniéndose de manifiesto una vez más su carácter reactivo. Los cambios en blandura de los flavonoides guardaron una relación directa con los cambios en polarizabilidad.

La electronegatividad disminuyó ligeramente por efecto del solvente en quercetina y (+)-catequina, pero en cianidina disminuyó apreciablemente desde 7.82 a 4.7 eV. Con ello se confirma que la tendencia a reterner los electrones se ve disminuída con la presesencia de un medio ambiente acuoso.

La electrofilicidad tuvo el mismo comportamiento que la afinidad electrónica, pero con valores más altos. Este resultado es congruente, ya que la electrofilicidad refleja la afinidad de una molécula por el máximo número de electrones que puede aceptar, en tanto que la afinidad electrónica indica la tendencia por un solo electrón, el primero que puede aceptar.

En base a los resultados anteriores, se establece que la interacción de los flavonoides en su estado neutro con un medio ambiente acuoso, favorece su estabilidad energética y su potencial antioxidante. De manera preliminar, quercetina y (+)-catequina demuestran mejor capacidad antioxidante que cianidina, la cual resultó muy reactiva.

#### Análisis de Funciones Condensadas de Fukui, Filicidad Local y Filicidad Grupal.

De los cuatro esquemas de partición de carga empleados en Fukui, se descartó el de Mulliken, debido a que en ciertos sitios atómicos presentó densidades de carga mayores a uno, cuando lo correcto es que la sumatoria del total de densidades de carga sea la unidad. Además, tuvo un mayor número de índices negativos comparado con NPA y ESP, ya que en HPA todos fueron positivos.

Se considera que los valores positivos en los índices de Fukui representan cantidades físicamente reales, mientras los valores negativos son cantidades físicamente irreales [Roy, et al., 2002]. Aunque hasta la fecha no existe una explicación satisfactoria para los signos de los índices de Fukui, Young, 2001, ha establecido que los valores positivos indican un enlace químico y los valores negativos representan disminución de la densidad electrónica en un sitio particular, o bien interacciones antienlazantes. Bajo esta perspectiva el mejor esquema para la partición de cargas lo representa el análisis poblacional de Hirshfeld y el menos recomendable el correspondiente a Mulliken [Roy, et al., 2002].

Los átomos con el máximo valor positivo en los índices de Fukui son predichos para ser los sitios preferidos en las reacciones nucleofílicas, electrofílicas y radicales, según corresponda [Oláh, et al., 2002].

Los tres tipos de reacciones determinadas mediante análisis de Fukui, son importantes para conocer los sitios antioxidantes de los flavonoides estudiados. El ataque nucleofílico puede ser indicativo de la región molecular preferencial para interaccionar con enzimas, ya que las enzimas poseen regularmente en sus sitios activos átomos de azufre (S), nitrógeno (N) y fósforo (P), los cuales poseen pares de electrones sin compartir que le confieren un comportamiento nucleofílico. El sitio para ataque electrofílico puede representar el lugar adecuado para quelación, ya que los metales como Fe y Cu, poseen cargas positivas que les dan un carácter electrofílico. Finalmente el

ataque radical puede enmarcar el lugar ideal para la reacción con radicales libres [Lehninger, 1995].

Como se comentó en la sección de revisión bibliográfica, la inhibición de ciertas enzimas y la quelación de metales traza como Fe y Cu, pueden evitar la formación de radicales libres al inicio del ciclo oxidativo; mientras que la interacción directa con radicales libres evita su acción sobre las membranas celulares, y a la vez su propagación.

**Quercetina.** Como se observa en la Tabla 13, los sitios señalados para ataque nucleofílico, electrofílico y radical en la molécula de quercetina, resultaron ser los mismos para las fases de gas y acuosa, lo cual pone de manifiesto que sus sitios reactivos no son alterados por efecto del cambio de fase. Las diferencias en los sitios reactivos se debieron a los distintos esquemas de partición de cargas utilizados.

**Ataque Nucleofílico.** De acuerdo a los índices de Fukui establecidos por HPA y NPA, el sitio donde se puede efectuar el ataque nucleofílico es C<sub>4</sub>, mientras que ESP indica C<sub>2</sub> (ver Tabla 13 y Fig. 7A). Los valores de filicidad local y filicidad grupal en la fase acuosa, mostraron total acuerdo con Fukui señalando los mismos sitios, como se puede apreciar en la Tabla 14.

Tabla 13. Índices de Fukui para la molécula de quercetina calculados en fase acuosa

Tipo de Carga/Fases		Índices de Fukui					
		átomo	ataque nucleofílico	átomo	ataque electrofílico	átomo	ataque radical
Hirshfeld (HPA)	Acuosa	C <sub>4</sub>	0.09936	O <sub>3</sub>	0.06327	O <sub>4</sub>	0.06811
	Gas	C <sub>4</sub>	0.07972	O <sub>3</sub>	0.05996	O <sub>4</sub>	0.06326
Naturales (NPA)	Acuosa	C <sub>4</sub>	0.14922	O <sub>3</sub>	0.07433	O <sub>4</sub>	0.08318
	Gas	C <sub>4</sub>	0.12634	O <sub>3</sub>	0.07948	O <sub>4</sub>	0.07912
Ajustadas a Potencial (ESP)	Acuosa	C <sub>2</sub>	0.12623	C <sub>8</sub>	0.08548	O <sub>4</sub>	0.10593
	Gas	C <sub>2</sub>	0.15387	C <sub>8</sub>	0.11713	O <sub>4</sub>	0.09756

Tabla 14. Análisis de filicidad local y filicidad grupal para el ataque nucleofílico de quercetina en fase acuosa

Átomo	Filicidad Local	Filicidad Grupal
C <sub>3</sub>	0.0978	0.586
C <sub>4</sub>	0.1972	0.587
<b>C<sub>2</sub></b>	<b>0.3968</b>	<b>1.029</b>
C <sub>3</sub>	0.2107	0.949
<b>C<sub>4</sub></b>	<b>0.4859</b>	<b>1.401</b>
C <sub>5</sub>	0.1865	0.689
C <sub>7</sub>	0.1775	0.631

C<sub>4</sub> representa el carbono del grupo carbonilo y sin duda constituye el sitio ideal para ataque nucleofílico, debido a su alta reactividad inducida por las diferencias de electronegatividad entre el carbono y el oxígeno. Los electrones  $\pi$  móviles de la nube electrónica compartida por ambos átomos, son fuertemente atraídos por el oxígeno, dejando deficiente al carbono, el cual adquiere un carácter electrofílico [Carey, 2000].

Aún cuando la resonancia es fuerte en quercetina, por su estructura plana y la presencia activante de los grupos OH, el grupo carbonilo es un fuerte desactivante, que interrumpe la deslocalización electrónica del anillo C con el anillo B, como se aprecia en la figura 8. Esto conlleva a que C<sub>4</sub> sea el sitio ideal para una adición nucleofílica, característica de los grupos carbonilos. Cuando el reactivo nucleofílico ataca, el carbono pasa de su hibridación SP<sup>2</sup> a tetraédrico formándose una carga parcial negativa que absorbe el oxígeno. Esta tendencia del oxígeno a adquirir los electrones y su capacidad para acomodar una carga negativa es lo que lo hace tan reactivo frente a los nucleófilos [Morrison y Boyd, 1998]. Adicionalmente, la presencia de dos fuertes puentes de hidrógeno intramoleculares establecidos por el oxígeno del grupo carbonilo con los grupos 5-OH y 3-OH, ofrecen una estabilidad molecular que facilita dicha reacción, y en cierta manera compensan la disrupción de la resonancia en el anillo C, debido a que contribuyen en la dispersión de la densidad de carga.

C<sub>2</sub> representa un segundo sitio alternativo, ya que está unido al heteroátomo de oxígeno. Sin embargo, la probabilidad de ataque nucleofílico en este carbono es baja comparada con C<sub>4</sub>, por las siguientes razones:

- El enlace de C<sub>2</sub> con el heteroátomo de oxígeno es característico de un éter aromático, el cual es bajamente polar. Debido a esta propiedad, en esa región molecular los efectos electronegativos del oxígeno son bajos y comparte sus pares de electrones con el carbono adyacente, formando así un octeto electrónico que tiende a desaparecer la carga positiva del C<sub>2</sub>. Además cuando un reactivo nucleofílico ataca, en el estado de transición se da lugar a la formación de una carga negativa, que debido al carácter liberador de electrones

del heteroátomo y del grupo 3-OH al que también tiene como vecino, se intensifica y difícilmente se podría dispersar sobre el anillo, produciendo un intermediario poco estable comparado con el que forma el grupo carbonilo.

- Otra razón importante, es que el oxígeno como heteroátomo también tiene funciones como orientador de las reacciones, y en este caso, tiende a orientar a los reactivos nucleofílicos hacia los carbonos  $\alpha$  y  $\gamma$  respecto a su posición [Katritzky y Lagowski, 1967]. El carbono (C2), que se une directamente a él, ha sido beneficiado con el octeto electrónico, por lo que el carbono adecuado para dicho ataque es el (, el cual corresponde a C4.

**Ataque Electrofílico.** Partiendo de los índices de Fukui establecidos por HPA y NPA, el sitio donde se puede efectuar el ataque electrofílico es O<sub>3</sub>, mientras que ESP indica que es C<sub>8</sub> (ver Tabla 13 y Fig. 7A). Los valores de filicidad local y filicidad grupal en la fase acuosa, señalan que el sitio adecuado es O<sub>3</sub> (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de filicidad local y filicidad grupal para el ataque electrofílico de quercetina en fase acuosa

Átomo	Filicidad Local	Filicidad Grupal
O <sub>1</sub>	0.1094	0.991
<b>O<sub>3</sub></b>	<b>0.1962</b>	<b>0.914</b>
<b>O<sub>4</sub></b>	<b>0.2726</b>	<b>1.056</b>
<b>O<sub>3</sub></b>	<b>0.3094</b>	<b>1.254</b>
<b>O<sub>4</sub></b>	<b>0.1875</b>	<b>1.127</b>
O <sub>5</sub>	0.1418	0.505
O <sub>7</sub>	0.1120	0.568
C <sub>8</sub>	0.1929	0.603

Como se comentó anteriormente, el heteroátomo de oxígeno tiene funciones como orientador de las reacciones aromáticas. En base a ello, tiende a orientar a los reactivos electrofílicos hacia el carbono que ocupa la posición  $\beta$  respecto a su ubicación [Katritzky y Lagowski, 1967]. En el caso de quercetina, dada la ubicación del heteroátomo, el cual es compartido por un par de anillos fusionados (A y C), el carbono  $\beta$  del anillo C corresponde a C<sub>3</sub>, al cual se encuentra unido O<sub>3</sub> como parte de un grupo OH sustituyente. Por otro lado, el carbono  $\beta$  del anillo A corresponde a C<sub>8</sub>. Bajo esta perspectiva se pensó que ambos átomos podrían ser sitios posibles para el ataque electrofílico. Sin embargo, con los valores filicidad local y filicidad grupal, se comprobó que O<sub>3</sub> es el sitio preferencial y se descarta C<sub>8</sub>. El oxígeno del grupo carboxilo (O<sub>4</sub>), así como los O<sub>4</sub> y O<sub>3</sub> del grupo catecol, también son sitios donde fácilmente puede ocurrir un ataque electrofílico, lo cual es apoyado por los valores de filicidad e

índices de Fukui (0.05 - 0.065 HPA y NPA), ya que tuvieron valores cercanos a O<sub>3</sub>. Según, Kostova, et al., 2005, regularmente el oxígeno del grupo carbonilo representa un sitio más favorable para ataque electrofílico, que el oxígeno de un grupo hidroxilo. Aunque para la quelación de metales de compuestos doblemente desprotonados, se ha observado que ambos tipos de oxígenos son similarmente efectivos.

**Ataque Radical.** Para este tipo de ataque fue señalado como sitio predilecto el O<sub>4</sub>, de manera unánime por HPA, NPA y ESP (Tabla 14), y también mediante índices de filicidad (Tabla 16). El O<sub>4</sub> forma parte del grupo carbonilo y constituye un sitio muy reactivo ya que esta cargado negativamente. La presencia de un oxígeno con carga negativa unido a un anillo aromático representa el mejor sitio liberador de electrones [Yukankis, 2006]. Es conocido que para establecer los ataques por radicales libres, se utiliza el índice de valencia libre, el cual representa la suma de índices de enlaces  $\pi$  de un átomo en relación a sus vecinos. De acuerdo a este índice los ataques radicalarios tendrán lugar sobre los átomos menos enlazados con sus vecinos [Bertran, 2000]. Sobre estas bases O<sub>4</sub> resultó el sitio más indicado para ataque radical, por su carga negativa y el enlace  $\pi$  que comparte con el carbono del anillo aromático. Como un sitio secundario se propone a O<sub>3</sub>, el cual mostró los índices de Fukui (0.05 HPA y NPA) y valores de filicidad más cercanos a O<sub>4</sub>.

Tabla 16. Análisis de filicidad local y filicidad grupal para el ataque radical de quercetina en fase acuosa

Átomo	Filicidad Local	Filicidad Grupal
O <sub>1</sub>	0.1526	1.020
O <sub>3</sub>	0.1300	0.750
O <sub>4</sub>	0.1968	0.822
<b>O<sub>3</sub></b>	<b>0.2148</b>	<b>1.102</b>
<b>O<sub>4</sub></b>	<b>0.3331</b>	<b>1.264</b>
O <sub>5</sub>	0.1500	0.597
O <sub>7</sub>	0.1171	0.599

Estos resultados demuestran que el anillo C es el más reactivo en quercetina, ya que los sitios preferenciales para los tres tipos de ataques fueron localizados en esa región molecular.

**(+)-Catequina.** A diferencia de la molécula de quercetina, (+)-catequina mostró una gran variación en los sitios para ataques nucleofílico, electrofílico y radical, por efecto de las fases de estudio y de los análisis poblacionales de carga

utilizados. Por esta razón se decidió enfocarse a los resultados en fase de agua, ya que son los de mayor interés.

**Ataque Nucleofílico.** Se plantean como sitios probables C<sub>3'</sub> y C<sub>4'</sub>, de acuerdo a HPA y NPA, y C<sub>2</sub> por medio de ESP, como se muestra en la Tabla 17 y la Fig. 7B. El análisis de filicidad local y filicidad grupal indicaron que C<sub>3'</sub> y C<sub>4'</sub> son los sitios ideales, descartándose C<sub>2</sub> (Tabla 18).

C<sub>2</sub> fue considerado un sitio posible para ataque nucleofílico, ya que es un carbono bencílico el cual se caracteriza por ser reactivo. Sin embargo, el hecho de ser el punto de unión entre dos anillos que no se encuentran dentro del mismo plano molecular, le resta posibilidad, por efectos estéricos. Sumado a que la carencia del doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> disminuye los efectos de conjugación, dificultando la dispersión de la carga en ese anillo, lo que implica la formación de intermediarios poco estables.

C<sub>3'</sub> y C<sub>4'</sub> constituyen el grupo catecol, ambos son carbonos secundarios por lo que pueden formar cationes con estabilidad comparable a los carbonos bencílicos. Adicionalmente tienen otros dos puntos a favor: la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre sus grupos hidroxilos, que permite la dispersión de la carga y la deslocalización de electrones por resonancia. Estos son dos de los factores polares más poderosos que afectan la estabilidad de las moléculas cargadas, y por lo mismo desempeñan un papel importante en la orientación, reactividad y el curso de una reacción orgánica [Morrison y Boyd, 1998].

Tabla 17. Índices de Fukui para la molécula de (+)-catequina calculados en fase acuosa

Tipo de Carga/Fases		Índices de Fukui					
		átomo	ataque nucleofílico	átomo	ataque electrofílico	átomo	ataque radical
Hirshfeld (HPA)	Acuosa	C <sub>3'</sub>	0.07806	C <sub>8</sub>	0.06591	C <sub>2'</sub>	0.07649
		C <sub>4'</sub>	0.07625	C <sub>10</sub>	0.06109		
	Gas	C <sub>4'</sub>	0.01670	O <sub>3'</sub>	0.06463	H <sub>4'</sub>	0.11048
				C <sub>8</sub>	0.06204		
Naturales (NPA)	Acuosa	C <sub>4'</sub>	0.08650	C <sub>10</sub>	0.11697	C <sub>2'</sub>	0.13399
				C <sub>8</sub>	0.09798		
	Gas	C <sub>4'</sub>	0.09987	C <sub>8</sub>	0.09921	C <sub>6</sub>	0.13399
Ajustadas a Potencial (ESP)	Acuosa	C <sub>2</sub>	0.70223	C <sub>10</sub>	0.15859	C <sub>2</sub>	0.33018
				C <sub>8</sub>	0.13533		
	Gas	C <sub>7</sub>	0.16364	C <sub>8</sub>	0.141422	H <sub>4'</sub>	0.24656

Tabla 18. Análisis de filicidad local y filicidad grupal para el ataque nucleofílico de (+)-catequina en fase acuosa

Átomo	Filicidad Local	Filicidad Grupal
<b>C<sub>3'</sub></b>	<b>0.1530</b>	<b>0.696</b>
<b>C<sub>4'</sub></b>	<b>0.1494</b>	<b>0.663</b>
C <sub>2</sub>	0.0261	0.206
C <sub>3</sub>	0.0290	0.110
C <sub>5</sub>	0.0066	0.029
C <sub>7</sub>	0.0061	0.025

Ataque Electrofílico. HPA indica que C<sub>8</sub> es el sitio más adecuado para ataque electrofílico en la fase acuosa, mientras que NPA y ESP proponen a C<sub>10</sub> (Tabla 17, Fig. 7B). Ambos resultados fueron respaldados por los valores de filicidad (Tabla 19). Los dos sitios señalados como preferenciales para ataque electrofílico, se consideran viables, ya que como en los casos anteriores, los efectos de orientación dirigidos por el heteroátomo y los grupos OH, parecen imponerse. Ambos sitios corresponden al carbono β respecto al heteroátomo de oxígeno por formar parte de anillos fusionados, y a su vez constituyen las orientaciones orto y para de los hidroxilos del anillo A. Los O<sub>3'</sub> y O<sub>4'</sub> del grupo catecol, así como los O<sub>5</sub> y O<sub>7</sub> del grupo resorcinol, presentaron valores muy cercanos a C<sub>8</sub> y C<sub>10</sub>, por lo que podrían competir como sitios activos para dicho tipo de reacción.

Tabla 19. Análisis de filicidad local y filicidad grupal para el ataque electrofílico de (+)-catequina en fase acuosa

Átomo	Filicidad	Filicidad Grupal
O <sub>1</sub>	0.0282	0.156
<b>O<sub>3'</sub></b>	<b>0.1039</b>	<b>0.393</b>
<b>O<sub>4'</sub></b>	<b>0.0969</b>	<b>0.392</b>
O <sub>3</sub>	0.0162	0.086
<b>O<sub>5</sub></b>	<b>0.0758</b>	<b>0.358</b>
<b>O<sub>7</sub></b>	<b>0.0976</b>	<b>0.405</b>
<b>C<sub>8</sub></b>	<b>0.1292</b>	<b>0.416</b>
<b>C<sub>10</sub></b>	<b>0.1197</b>	<b>0.356</b>



**Ataque Radical.** El sitio sugerido por HPA y NPA para ataque radical en (+)-catequina, es C<sub>2</sub>, mientras que ESP propone a C<sub>2</sub> (ver Tabla 17). Como se aprecia en la Tabla 20, el sitio favorecido por los valores de filicidad fue el C<sub>2</sub>. Por regla general, la formación de radicales libres favorece la posición de un carbono bencílico (C<sub>2</sub>) más que el de un carbono secundario (C<sub>2'</sub>); sin embargo, en este caso sucedió lo contrario, lo cual puede ser el resultado de que el carbono bencílico sea el sitio de unión entre dos anillos que no están dentro del mismo plano molecular, es decir los factores estéricos no lo favorecieron. Este caso es similar al observado en el ataque nucleofílico. Sin embargo, por la resonancia que se establece entre los anillos B y C cuando se forma el radical bencílico, se sugiere que bajos ciertas condiciones podría favorecerse su formación. También pueden ser sitios muy importantes para ataque radical los oxígenos 3' y 4' del grupo catecol.

Tabla 20. Análisis de filicidad local y filicidad grupal para el ataque radical de (+)-catequina en fase acuosa

Átomo	Filicidad Local	Filicidad Grupal
O <sub>1</sub>	0.0201	0.181
<b>O<sub>3'</sub></b>	<b>0.0923</b>	<b>0.545</b>
<b>O<sub>4'</sub></b>	<b>0.0831</b>	<b>0.528</b>
O <sub>3</sub>	0.0154	0.098
O <sub>5</sub>	0.0400	0.151
O <sub>7</sub>	0.0510	0.169
<b>C<sub>2'</sub></b>	<b>0.1499</b>	<b>0.558</b>
C <sub>2</sub>	0.0211	0.181

La carencia del grupo ceto y el doble enlace C2-C3, traslada la reactividad de (+)-catequina hacia los anillos A y B.

**Cianidina.** Se observaron variaciones en los átomos señalados por Fukui como sitios reactivos, bajo los esquemas HPA, NPA y ESP, tanto en las fases de gas y agua, por lo que se dio prioridad a los resultados en fase acuosa.

**Ataque Nucleofílico.** Como se puede apreciar en la Tabla 21 y Fig. 7C, el sitio para ataque nucleofílico según HPA es C<sub>4</sub>, y para NPA y ESP sería preferencialmente C<sub>2</sub>. Los valores de filicidad local y filicidad grupal corroboraron ambos sitios con prioridad para C<sub>4</sub> (Tabla 22). El grupo C<sub>4</sub> representa el carbono  $\gamma$  del heteroátomo de oxígeno y la posición orto del 3-OH, mientras C<sub>2</sub> representa el carbono  $\alpha$  del heteroátomo y también la posición orto del 3-OH, las cuales constituyen las orientaciones comunes para ataque nucleofílico, de acuerdo a las reglas de reactividad seguidas por heteroátomos y grupos activantes de moléculas aromáticas [Morrison y Boyd, 1998].