



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y  
METALURGIA**

**CARACTERIZACIÓN TEÓRICO-EXPERIMENTAL  
DE LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES  
ANTIRRADICALES  
EN PROCIANIDINAS AISLADAS DE SALVADO DE  
SORGO CAFÉ**

**Trabajo Profesional**

**Que para obtener el título de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**Presenta:**

**Francisco Javier Carmelo Luna**

**Hermosillo, Sonora**

**Enero de 2015**

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS .....   | i    |
| DEDICATORIA.....  | iii  |
| LISTA DE TABLAS .....   | vii  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | viii |
| RESUMEN .....   | ix   |
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1    |
| II. OBJETIVOS .....   | 3    |
| 2.1 Objetivo General.....   | 3    |
| 2.2 Objetivos Específicos.....  | 3    |
| III. ANTECEDENTES .....   | 5    |
| 3.1 Producción y Usos Industriales de Sorgo .....                             | 5    |
| 3.2 Estructura del Grano de Sorgo .....                                       | 5    |
| 3.3 Compuestos Fenólicos y Procianidinas de Sorgo .....                       | 7    |
| 3.3.1 Ácidos Fenólicos .....  | 7    |
| 3.3.2 Flavanoles.....   | 8    |
| 3.3.3 Antocianinas .....  | 8    |
| 3.3.4 Poliflavanoles.....   | 10   |
| 3.4 Función de los Compuestos Fenólicos y Procianidinas de Sorgo .....        | 12   |
| 3.5 Métodos Empleados para la identificación de Procianidinas .....           | 12   |
| 3.5.1 Espectroscopía UV-Vis .....   | 13   |
| 3.5.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....       | 13   |
| 3.5.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC-UV-Vis.....               | 14   |
| 3.6 Mecanismos Antioxidantes .....  | 15   |
| 3.7 Relación de la Estructura y Capacidad Antirradical de Procianidinas ..... | 17   |
| 3.8 Métodos para Determinar la Capacidad Antirradical .....                   | 18   |
| 3.8.1 Sistemas Monofásicos y Heterofásicos.....                               | 19   |
| 3.8.2 Métodos Cinéticos.....  | 19   |
| 3.8.3 Métodos Computacionales.....  | 20   |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 22   |
| 4.1 Material Vegetal.....   | 22   |

|  |    |
|--|----|
| 4.2 Limpieza del Grano de Sorgo .....  | 22 |
| 4.3 Determinación del Contenido de Humedad en el Grano de Sorgo .....  | 22 |
| 4.4 Obtención del Salvado de Sorgo por Decorticación y Reducción del<br>Tamaño de Partícula .....                          | 22 |
| 4.5 Extracción de Compuestos Fenólicos Presentes en el Salvado de Sorgo ..   | 23 |
| 4.6 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales .....  | 23 |
| 4.7 Aislamiento de la Fracción de Procianidinas de Salvado de Sorgo a partir<br>del Extracto Fenólico .....                | 24 |
| 4.8 Análisis de la Fracción de Procianidinas por Espectroscopia UV-Vis.....  | 24 |
| 4.9 Análisis de la Fracción de Procianidinas Mediante Espectroscopia<br>Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)..... | 25 |
| 4.10 Análisis de la Fracción de Procianidinas Mediante HPLC-UV-Vis en Fase<br>Reversa .....                                | 25 |
| 4.11 Análisis de Catálisis Ácida con Floroglucinol Mediante HPLC-UV-Vis en<br>Fase Reversa .....                           | 26 |
| 4.12 Cuantificación de Procianidinas.....  | 27 |
| 4.13 Cálculo del Porcentaje de Inhibición de Peroxidación Lipídica.....  | 28 |
| 4.14 Inhibición del Radical DPPH• Mediante el Cálculo de Tasas Constantes<br>de Segundo Orden .....                        | 29 |
| 4.15 Determinación de la Inhibición del Radical ABTS <sup>•+</sup> Mediante el Ensayo<br>TEAC.....                         | 30 |
| 4.16 Cálculos Computacionales .....  | 31 |
| 4.17 Análisis Estadístico .....  | 32 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 33 |
| 5.1 Contenido de Humedad de los Granos de Sorgo .....  | 33 |
| 5.2. Contenido de Compuestos Fenólicos en las Fracciones de Salvado de<br>Sorgo.....                                       | 33 |
| 5.3 Identificación de la Fracción de Procianidinas.....  | 34 |
| 5.3.1 Análisis de Espectroscopía UV-Vis.....   | 34 |
| 5.3.2 Análisis de Espectroscopía IR .....  | 37 |
| 5.3.3 Análisis HPLC-UV-Vis en Fase Reversa.....  | 39 |
| 5.3.4 Análisis de Catálisis Ácida con Floroglucinol Mediante HPLC-UV-Vis<br>en Fase Reversa.....                           | 42 |
| 5.4 Cuantificación de Procianidinas.....   | 45 |
| 5.5 Porcentaje de Inhibición de Peroxidación Lipídica .....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 5.6 Inhibición del Radical DPPH <sup>•</sup> Mediante el Cálculo de Tasas Constantes de Segundo Orden ..... | 47 |
| 5.7 Inhibición del Radical ABTS <sup>•+</sup> Mediante el Ensayo TEAC .....                                 | 50 |
| 5.8 Cálculos Computacionales .....  | 51 |
| 5.8.1 Optimización de la Geometría Molecular .....  | 51 |
| 5.8.2 Propiedades de Reactividad Antirradical .....   | 55 |
| VI. CONCLUSIONES .....  | 59 |
| VII. RECOMENDACIONES .....  | 60 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA .....  | 61 |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla  | Página |
|--|--------|
| 1 Concentración de compuestos fenólicos en las fracciones de salvado de sorgo a diferentes tiempos de decorticación..... | 33     |
| 2 Porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica del extracto fenólico, fracción de PCs y estándares.....             | 47     |
| 3 Tasas constantes de segundo orden del extracto fenólico, fracción de PCs y estándares.....                             | 49     |
| 4 Inhibición del radical ABTS <sup>•+</sup> por el extracto fenólico y fracción de PCs mediante el ensayo TEAC.....      | 51     |
| 5 Ángulos diedros de las moléculas de procianidinas optimizadas con el método semiempírico PM6.....                      | 56     |
| 6 Propiedades de reactividad y estabilidad de PCs de salvado de sorgo.....   | 58     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura   | Página |
|--|--------|
| 1 Sección esquemática del grano de sorgo.....  | 6      |
| 2 Principales compuestos fenólicos en el salvado de sorgo.....   | 9      |
| 3 Estructura básica de procianidinas y pro-3-deoxiantocianidinas.....  | 11     |
| 4 Conformaciones compacta y extendida de un dímero de procianidinas.....   | 11     |
| 5 Espectros UV-Vis de la fracción PCs y estándares de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B1.....                         | 34     |
| 6 Espectros UV-Vis de la fracción PCs y estándares de ácidos fenólicos.....  | 35     |
| 7 Espectros UV-Vis de la fracción PCs y estándar PB1.....  | 36     |
| 8 Espectros IR de la fracción PCs y estándar PB1.....  | 38     |
| 9 Espectros IR de la fracción PCs y estándares de ácidos fenólicos.....  | 40     |
| 10 Cromatogramas HPLC-UV-Vis del extracto fenólico completo mezcla de estándares de ácidos fenólicos y PCs.....                      | 41     |
| 11 Cromatogramas HPLC-UV de los productos formados en la reacción de floroglucinolisis del estándar de PB1 y la fracción de PCs..... | 44     |
| 12 Comportamiento cinético de la fracción PCs y estándar PB1 en la reacción con DPPH.....  | 48     |
| 13 Comparación de distancias de enlaces entre átomos de carbono de la moléculas tetra-O-metil-(+)-catequina.....                     | 53     |
| 14 Moléculas de procianidinas optimizadas por el método semiempírico PM6.....  | 54     |

## RESUMEN

El salvado de sorgo constituye una fuente importante de antioxidantes naturales, entre los que destacan las procianidinas (PCs) por su abundancia. Dichos compuestos son multifuncionales y pueden inhibir las acciones perjudiciales de un amplio rango de radicales libres involucrados en la oxidación de alimentos y enfermedades. Sin embargo, debido a su distinta composición y estructura las PCs presentan propiedades antirradicales variables que requieren ser determinadas. En este estudio se caracterizaron las PCs extraídas de salvado de sorgo de una variedad café y se evaluó su capacidad antirradical empleando métodos experimentales y computacionales. Se encontró que la fracción de PCs constituye el 61.43% de los fenoles totales de salvado de sorgo, de los cuales 59.05% son oligómeros con grado de polimerización  $\geq 8$ , 0.29% corresponde al dímero PB1, 0.15% a (+)-catequina, 0.14% a (-)-epicatequina y 1.80% a PCs no identificadas. Las unidades constitutivas de estas PCs fueron 89% (-)-epicatequina y 11% (+)-catequina. La fracción de PCs mostró altos porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica y elevadas tasas constantes de segundo orden frente al radical DPPH<sup>•</sup>, sin embargo estas no fueron superiores a las que alcanzó el extracto fenólico completo. La capacidad de inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> fue mayor para la fracción de PCs que el extracto fenólico. El estudio computacional indica que los oligómeros de PCs mostraron menores potenciales de ionización (IP) que los monómeros, mientras que los heptámeros, octámeros y nonámeros presentaron las menores entalpías de disociación de enlace (BDE), lo que en conjunto representa una mayor capacidad antirradical.



## I. INTRODUCCIÓN

La oxidación es una de las principales causas de deterioro en los alimentos y en el desarrollo de enfermedades. La evidencia científica de que el uso de antioxidantes y fármacos sintéticos producen efectos tóxicos, ha llevado a la búsqueda constante de fuentes alternativas de antioxidantes naturales. El salvado de sorgo café constituye una fuente importante de antioxidantes naturales, entre los que destacan las procianidinas (PCs) por su abundancia y diversidad. Sin embargo, debido a que el salvado de sorgo no es un alimento comúnmente incluido en la dieta humana, sino más bien un subproducto agroindustrial, existen pocos estudios relacionados con su potencial antioxidante.

Las PCs son compuestos naturales multifuncionales que pueden inhibir las acciones perjudiciales de un amplio rango de radicales libres involucrados en el deterioro de alimentos y en la patogénesis de enfermedades coronarias, cáncer y Alzheimer, entre otras. Por esta razón, son reconocidas como candidatas potenciales para ser usadas como ingredientes funcionales en alimentos y fármacos para el tratamiento de enfermedades de origen oxidativo.

No obstante, las PCs tienen estructuras muy complejas por que se componen de diferentes unidades monoméricas, tipos de enlaces, grados de polimerización y se encuentran en forma de mezclas de isómeros y conformeros. Si bien es cierto que la diversidad en estructuras les brinda propiedades multifuncionales, también varía su capacidad antioxidante y por otra parte dificulta su aislamiento de los tejidos vegetales porque eleva los costos de purificación. Esta es la razón por la que casi no se cuenta con estándares comerciales de PCs y los que se venden son muy costosos, lo cual ha limitado su estudio. Adicionalmente la reacción de PCs con radicales libres implica la

formación de múltiples intermediarios y productos de reacción, los cuales debido a sus cortos tiempos de vida media, y múltiples conformaciones, dificultan aún más su aislamiento para establecer la relación de su composición, estructura y reactividad con las propiedades antirradicales.

Por lo comentado anteriormente, existe la necesidad de aumentar la comprensión de las propiedades antirradicales de compuestos como las PCs en una variedad de matrices de alimentos y subproductos agroindustriales, entre los que se incluye el salvado de sorgo café, así como, el empleo de métodos reproducibles y de bajo costo para caracterizarlas. Una ruta viable para obtener tal información es mediante el uso de métodos teóricos (computacionales), que además de simular distintas conformaciones, al combinarse con metodologías experimentales permiten optimizar los costos y tiempos de investigación, generando datos confiables.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Caracterizar mediante métodos teóricos y experimentales la estructura y capacidad antirradical de las PCs extraídas del salvado de sorgo de una variedad café.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Obtener un extracto fenólico a partir de la fracción de salvado de sorgo seleccionada.
2. Aislar las PCs a partir del extracto fenólico mediante cromatografía preparativa.
3. Identificar las PCs extraídas del salvado de sorgo empleando espectroscopias ultravioleta-visible (UV-Vis) e infrarroja (IR) y cromatografía líquida de alta resolución con un detector UV-Vis (HPLC-UV-Vis).
4. Cuantificar las PCs extraídas del salvado de sorgo mediante HPLC-UV-Vis.
5. Calcular el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica de las PCs de salvado de sorgo y algunos de sus estándares para conocer su capacidad antirradical .

6. Determinar las tasas constantes de segundo orden de las PCs de salvado de sorgo y algunos de sus estándares frente al radical DPPH, así como el ensayo ABTS para conocer su capacidad antirradical .
7. Realizar cálculos computacionales de reactividad de las PCs mayoritarias identificadas en el salvado de sorgo para relacionarlos con su capacidad antirradical, tomando en cuenta distintas conformaciones.

### III. ANTECEDENTES

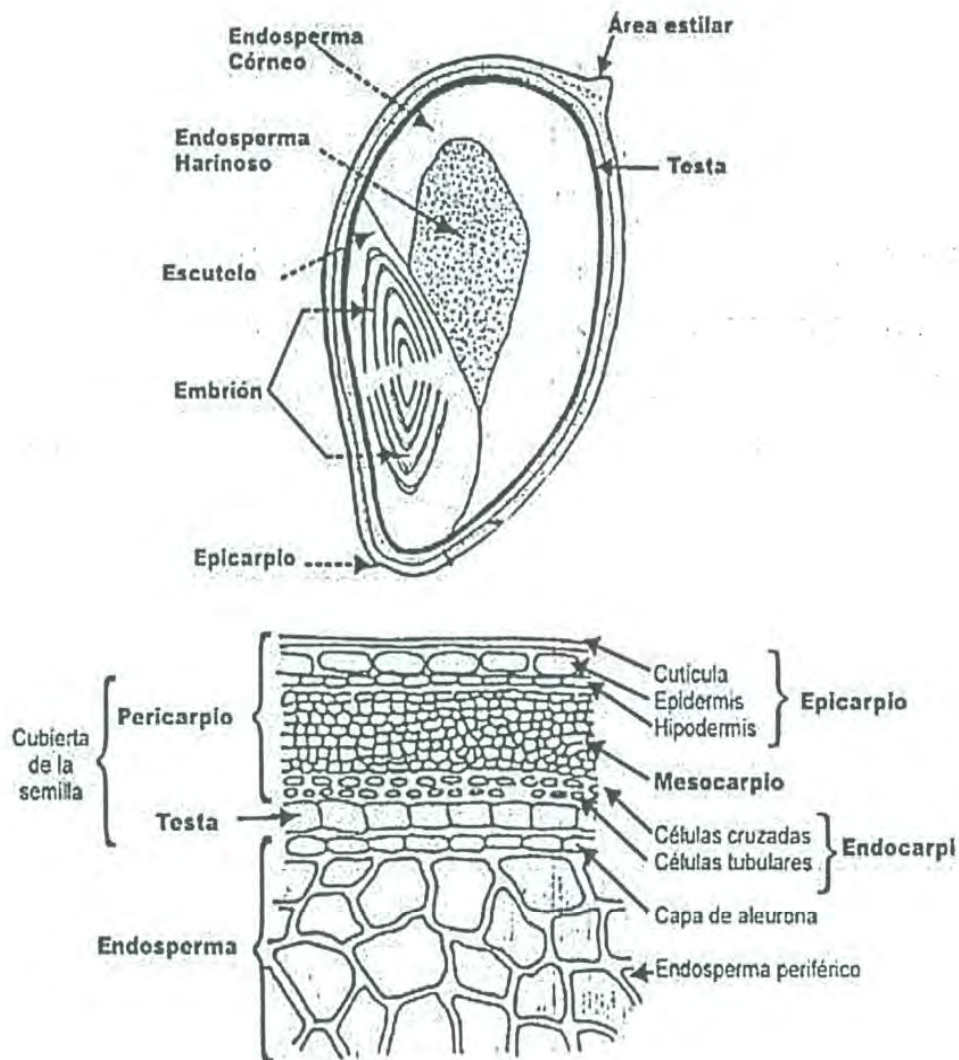
#### 3.1 Producción y Usos Industriales de Sorgo

El sorgo es el quinto cereal en importancia a nivel mundial después del maíz, el trigo, el arroz y la cebada. Alrededor del 60% de la producción mundial de sorgo se concentra en países subdesarrollados, por ejemplo en el año 2011 se produjeron 54 millones de toneladas, encontrándose dentro de los principales países productores la India con una participación de 12,9%, Nigeria con el 12,7%, México con el 11,8%, Estados Unidos con el 10% y, en el quinto lugar Argentina con un poco más del 8% (FAO, 2013). El sorgo es un cultivo que se puede incluir en las rotaciones resultando beneficioso para el suelo y con bajo costo en relación al maíz, además puede ser un buen reemplazante de éste en la dieta nutritiva, sobre todo en períodos de sequía debido a que es más eficiente en la utilización del agua (FAO, 2013). Los usos del sorgo son múltiples y dependen de su genética, se puede utilizar para consumo humano y para la alimentación animal; así mismo posee propiedades como insumo para la producción de etanol, licor destilado, papel, adhesivos, refinamiento de minerales y elaboración de embutidos, entre otros usos industriales (FAO, 2013, Xu *et al*, 2011).

#### 3.2 Estructura del Grano de Sorgo

Como se aprecia en la Figura 1, el grano de sorgo se compone de tres partes fundamentales: pericarpio que constituye la cobertura del grano, endospermo o tejido de reserva y embrión que representa la futura planta. El pericarpio se subdivide a su vez en tres capas que son el epicarpio, mesocarpio y

endocarpio, las cuales representan la parte externa (cutícula), media e interna, respectivamente. Inmediatamente después del endocarpio se encuentra una capa fuertemente pigmentada denominada testa, en la cual se concentra la mayor parte de las PCs. Contigua a la testa se ubica la capa de aleurona que representa la primera porción del endospermo. Durante la molienda o el decortinado del grano de sorgo, se obtiene el salvado, el cual en concreto procede de las cinco capas más externas del grano y son el epicarpio (cutícula), mesocarpio, endocarpio, testa y la capa de aleurona.



**Figura 1.** Sección esquemática del grano de sorgo (Frederiksen, 1986; Rooney, 1971).

### 3.3 Compuestos Fenólicos y Procianidinas de Sorgo

Entre los cereales, el sorgo es el que tiene mayor contenido de compuestos fenólicos alcanzando hasta 6% en algunas variedades (Desphande *et al.*, 1986; Awika *et al.*, 2004). El genotipo y las condiciones ambientales de crecimiento influyen la cantidad y tipo de compuestos fenólicos presentes en cada cultivar. Es conocido que las variedades de sorgo con testas pigmentadas y pericarpio grueso tienen mayor contenido de estos compuestos, ya que es en las capas externas que constituyen el salvado donde más se concentran (Dykes *et al.*, 2005). De manera general el sorgo contiene casi todas las clases de compuestos fenólicos, como son: ácidos fenólicos, flavonoides (flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanoles, antocianinas, poliflavanoles), chalconas, auronas, hidroxycoumarinas, lignanos e hidroxiestilbenos (Krueger *et al.*, 2003). Sin embargo, las principales clases de compuestos fenólicos que se concentran en el salvado de sorgo con testa pigmentada son los ácidos fenólicos y algunos flavonoides entre los que destacan los flavanoles, antocianinas y poliflavanoles.

#### 3.3.1 Ácidos Fenólicos

Entre estos se encuentran ácidos hidroxibenzoicos (*p*-hidroxibenzoico, gálico, protocateico, vanílico, siríngico) y ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, *p*-coumárico, sinápico, cafeico), los cuales pueden existir en forma libre o enlazados como ésteres (Krueger *et al.*, 2003; Awika y Rooney, 2004). Sus estructuras representativas pueden ser visualizadas en la Figura 2, donde se puede apreciar que se constituyen de un anillo y se diferencian del resto de compuestos fenólicos en que aparte de grupos hidroxilos poseen un grupo

carboxilo que les da propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes (Amorim *et al.*, 1973).

### 3.3.2 Flavanoles

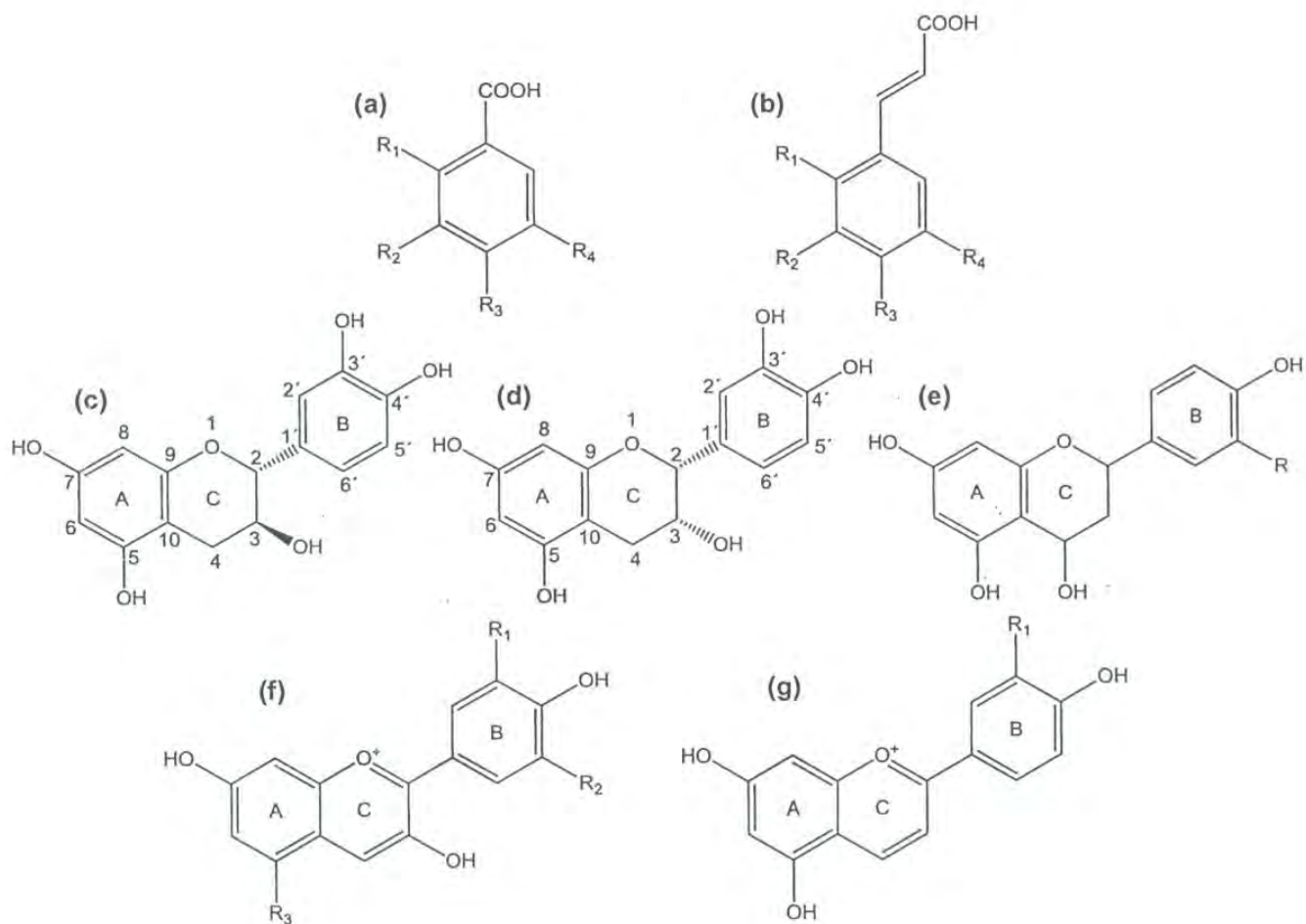
Incluyen flavan-3-ols y flavan-4-ols en sus formas monoméricas. Los flavan-3-ols están constituidos por (+)-catequina y (-)-epicatequina, cuya estructura básica es el núcleo flavan (Figura 2), que consiste de 15 carbonos arreglados en tres anillos denominados A, C y B (Pietta, 2000; Pérez-Trueba, 2003). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 10, y los del anillo B desde del 1' al 6' (Kühnau, 1976; Schmidt, 2011). En el anillo A poseen un grupo resorcinol formado por dos hidroxilos en posición meta (5-OH y 7-OH) y en el anillo B un grupo catecol formado por dos hidroxilos en posición orto (3'-OH y 4'-OH). Adicionalmente en el anillo C poseen un grupo hidroxilo en el carbono 3 (3-OH) por el cual reciben el nombre distintivo de flavan-3-ols. Los flavan-4-ols, poseen una estructura muy similar a los flavan-3-ols, únicamente difieren en la posición del hidroxilo del anillo C (4-OH), como se puede apreciar en la Figura 2. Dentro de los flavan-4-ols más comunes están apiforol o leucoapiginidina y luteoforol o leucoluteolinidina (Dicko *et al.*, 2005).

### 3.3.3 Antocianinas

Las antocianinas también se caracterizan por tener el grupo catecol, el grupo resorcinol y el grupo 3-OH al igual que los flavanoles, pero se distinguen por presentar un doble enlace entre C3 y C4 del anillo C que les da mayor conjugación (Pietta, 2000). Las más abundantes y características del sorgo son



las 3-deoxiantocianidinas como apigeninidina y luteolinidina, ya que estas casi no se encuentran en ningún otro tejido vegetal. Otras antocianinas detectadas en cantidades minoritarias en sorgo son cianidina, fisetinidina y pelargonidina (Hahn, 1984; Awika y Rooney, 2004).



**Figura 2.** Estructuras de (a) ácidos hidroxibenzoicos, (b) ácidos hidroxicinámicos, (c) (+)-catequina y (d) (-)-epicatequina pertenecientes a los flavan-3-ols, (e) flavan-4-ols, (f) antocianidinas, (g) 3-deoxiantocianidinas

### 3.3.4 Poliflavanoles

Los poliflavanoles encontrados en sorgo son esencialmente polímeros de flavan-3-ols conocidos como procianidinas o proantocianidinas y las pro-3-deoxiantocianidinas cuyas estructuras se muestran en la Figura 3. De acuerdo con reportes bibliográficos, las procianidinas de sorgo son homopolímeros que se forman de unidades de extensión de (-)-epicatequina y como unidad terminal (+)-catequina, unidas predominantemente mediante enlaces interflaván del tipo C-C como el C4-C8 en posición  $\beta$  o hacia enfrente (procianidinas tipo B) y ocasionalmente por enlaces C-O-C (procianidinas tipo A) (Gupta y Hashlam, 1978; Gu *et al.*, 2002, 2003; Krueger *et al.*, 2003, Awika y Rooney, 2004). Las PCs también se caracterizan por tener tres centros quirales: C2, C3 y C4, que las hace muy susceptibles a cambios en configuración y conformación. A partir de C4 que es el sitio donde se unen los monómeros y se establece la unión interflaván se forman las conformaciones compacta (C) y extendida (E) (Figura 4). Un camino para distinguir estas conformaciones es el valor de ángulo diedro formado entre los cuatro átomos involucrados en el enlace interflaván (C3-C4-C8-C9). En la conformación compacta se forman ángulos diedros positivos y en la conformación extendida ángulos diedros negativos (Khan *et al.*, 1997; Tarascou *et al.*, 2007).

Los cultivares de sorgo con pericarpio negro tienen los más altos niveles de flavan-4-ols, 3-deoxiantocianidinas y antocianinas comunes, los de pericarpio rojo poseen principalmente 3-deoxiantocianidinas, mientras que en las variedades con pericarpio café abundan los flavan-3-ols y procianidinas, aunque pequeñas proporciones de 3-deoxiantocianidinas a veces son encontradas (Dicko *et al.*, 2005; Awika y Rooney, 2004).

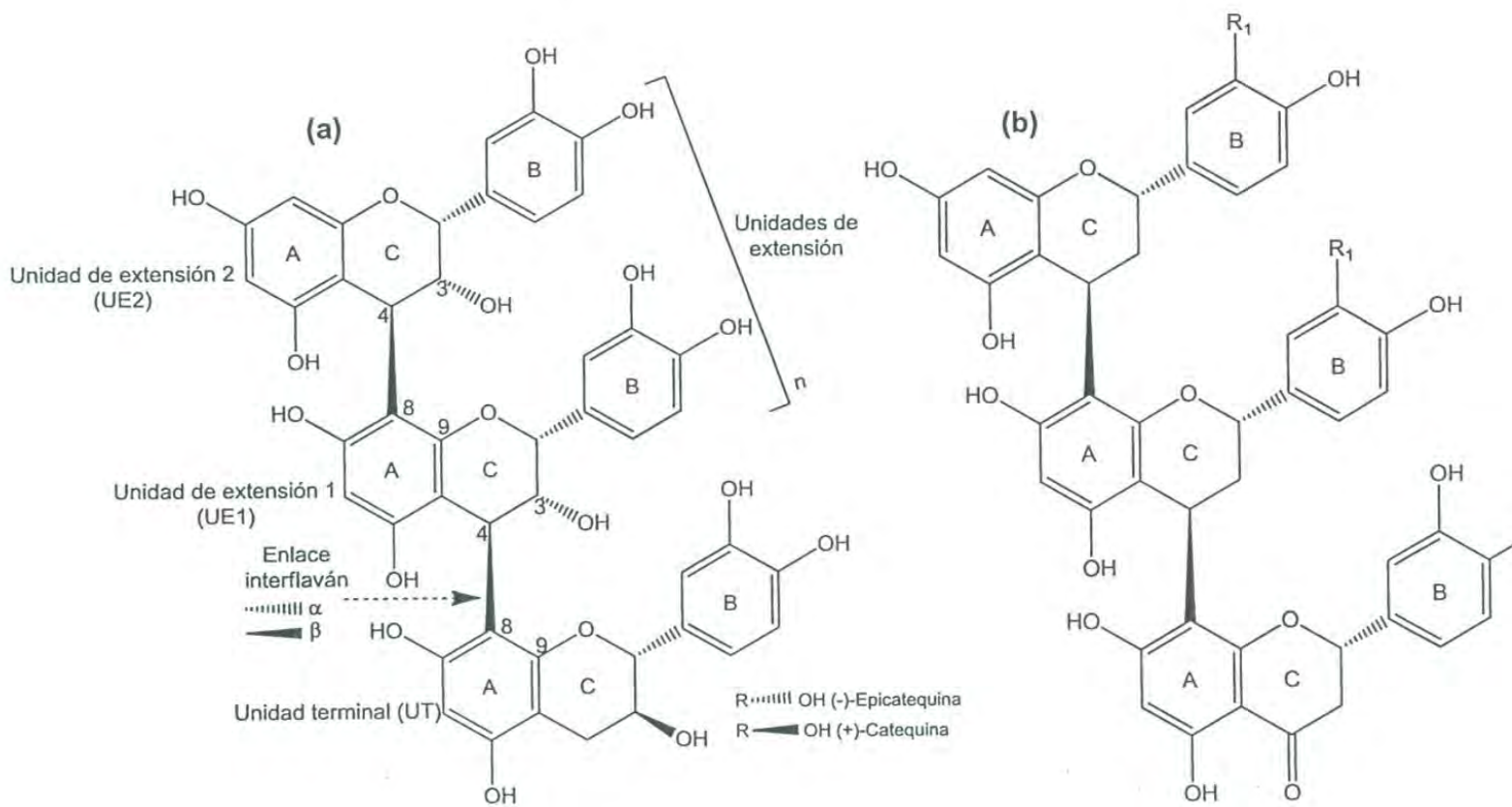


Figura 3. Estructura básica de procianidinas (a) y pro-3-deoxiantocianidinas (b).

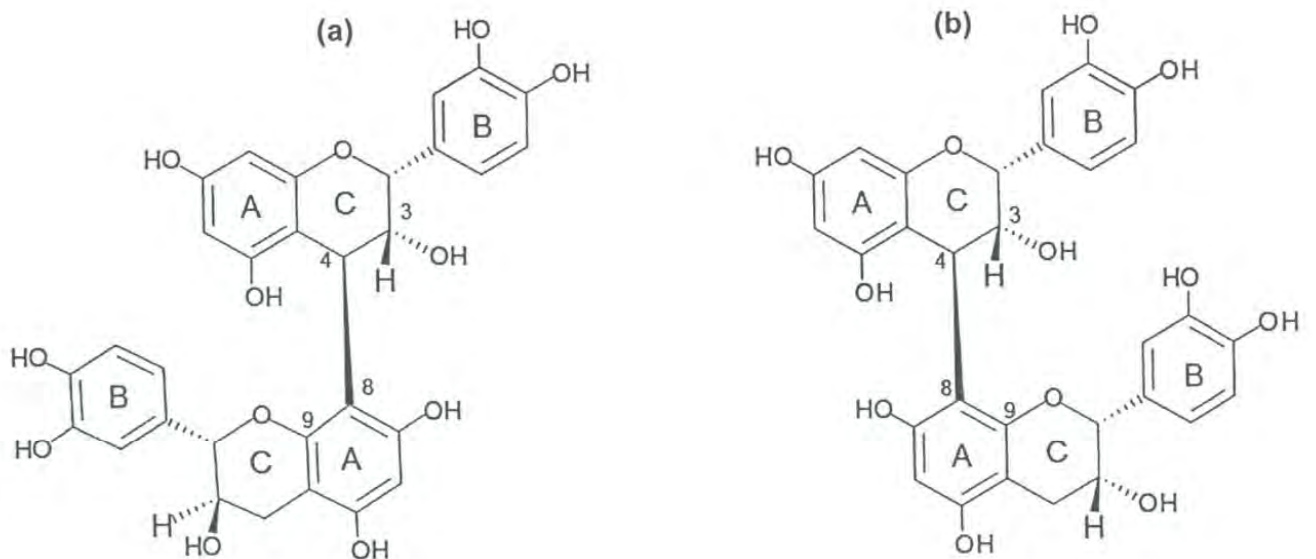


Figura 4. Conformaciones compacta (a) y extendida (b) de un dímmero de procianidinas (Castro, 2013).

### 3.4 Función de los Compuestos Fenólicos y Procianidinas de Sorgo

Los compuestos fenólicos juegan un rol importante en el metabolismo de las plantas y en su protección contra diferentes tipos de estrés. En específico las PCs protegen a las plantas contra el ataque de depredadores herbívoros (pájaros, insectos), microorganismos patógenos, mohos, sequía y germinación prematura. En relación a la función que tienen las PCs de sorgo en la salud, se han encontrado efectos terapéuticos positivos contra el melanoma humano (Gomez-Cordoves *et al.*, 2011). Se les asocia con pérdida de peso en estudios *in vivo* realizados con cerdos y conejos (Ambula *et al.*, 2001), también previenen las caries dentales (Xu *et al.*, 2011). Mediante estudios *in vivo* efectuados en ratones enfermos con cáncer de pulmón se ha comprobado la actividad antioxidante y antitumoral de las PCs de sorgo (Wu *et al.*, 2011).

Las PCs también han mostrado inhibir varios tipos de virus incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), el virus de la influenza y el herpes simple (Chan y Kim, 1998; Okuda *et al.*; 1991, Lu *et al.*, 2004; Hamauzu *et al.*, 2005). Tienen actividad antihipertensiva, antialérgica, antiartrítica, antiinflamatoria, y disminuyen los niveles de glucosa en sangre (Awika y Rooney, 2004; Ramirez *et al.*, 2004). En los alimentos, tanto frescos como procesados, las PCs juegan un rol importante en la estabilidad del color, sabor y astringencia (Labarbe *et al.*, 1999).

### 3.5 Métodos Empleados para la identificación de Procianidinas

En los últimos años se ha enfocado una reciente atención en identificar la estructura de los flavonoides, particularmente las PCs, y la relación que esta

presenta con sus propiedades fisiológicas sobre la salud humana (Andersen *et al.*, 2006). Por ello, los métodos espectroscópicos resultan una forma rápida y confiable para obtener una amplia información estructural de la molécula, en todas las fases de la materia, en compuestos puros o mezclas (Lambert *et al.*, 1998).

### **3.5.1 Espectroscopía UV-Vis**

Mide la energía y la probabilidad de promover a la molécula de su estado electrónico basal a un estado excitado, es decir, se mide la energía necesaria para mover a un electrón de un orbital ocupado hacia uno desocupado más alto. La espectroscopía de UV-Vis es útil para detectar los grupos funcionales de la molécula de acuerdo con la posición e intensidad de la banda de absorción (Lambert *et al.*, 1998). Los compuestos fenólicos presentan dos bandas características en el UV-Vis, la primera en el rango de 240-285 nm y la segunda entre 300-500 nm. Para las PCs la banda característica se sitúa entre el rango de 278-280 nm. (Andersen *et al.*, 2006).

### **3.5.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

En una molécula los átomos vibran uno con respecto al otro y los enlaces individuales sufren estiramientos que pueden ser simétricos o asimétricos. Estos movimientos pueden ser dentro o fuera del plano molecular y están asociados con un modo de vibración que resulta particular para cada molécula. La espectroscopía de infrarrojo permite identificar grupos funcionales,

composición e interacción entre los enlaces, dando como resultado la huella dactilar del compuesto (Lambert *et al.*, 1998; Siebert *et al.*, 2007).

En años recientes, técnicas de FTIR han sido aplicadas en la caracterización de sistemas complejos de flavonoides presentes en vinos, donde la precisión del espectro hace posible establecer modelos que permiten clasificar el origen del extracto con respecto a la variedad de compuestos fenólicos presentes en este. (Andersen *et al.*, 2006).

### **3.5.3 Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC-UV-Vis**

La cromatografía líquida de alta resolución forma parte de la cromatografía analítica y es una de las herramientas más empleadas en el estudio de compuestos, sobre todo en el análisis de mezclas que involucran PCs y otros compuestos fenólicos. El HPLC tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en cualquier muestra siempre y cuando esta sea soluble en líquidos compatibles con el equipo, denominados como fases móviles (Chiu *et al.*, 2002; Marston, 2007)

La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria (columna). De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector UV-Vis el cual genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo del compuesto, el tiempo en el cual se genera la señal es llamado tiempo de retención (Sullivan *et al.*, 1993; Justino, 1997).

### 3.6 Mecanismos Antioxidantes

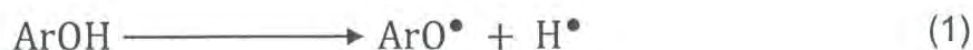
De todas las propiedades fisicoquímicas y biológicas que poseen las PCs, se considera de mayor importancia la actividad antioxidante, por el gran impacto que tiene en el área de la salud y los alimentos. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y PCs se debe principalmente a sus propiedades de reducción-oxidación denominadas "redox" (Bors *et al.*, 2001).

Los antioxidantes son especies químicas que son capaces de disminuir el estrés oxidativo mediante cuatro mecanismos básicos: inhibición de radicales libres, quelación de metales, inactivación de enzimas oxidantes y mediante la sobrerregulación de defensas antioxidantes formadas en los organismos vivos (Van Acker *et al.*, 1996; Pietta, 2000; Hotta *et al.*, 2001; Meo *et al.*, 2013). De estos mecanismos el que más variantes involucra y constituye el de mayor interés para este estudio, es el de inhibición de radicales libres.

Los radicales libres son especies químicas que poseen electrones desapareados, por lo que son muy reactivos y resultan perjudiciales en los alimentos y organismos vivos (Halliwell *et al.*, 1992). Debido a su inestabilidad generan reacciones en cadena atacando biomoléculas como los lípidos, proteínas y DNA para compensar su deficiencia electrónica (González-Torres *et al.*, 2000). La función de los antioxidantes es donar sus átomos de hidrógeno o electrones a los radicales libres a una tasa más rápida que las biomoléculas que constituyen el sustrato para estabilizarlos, evitando así su propagación. (Wright *et al.*, 2001). Este mecanismo opera a través de tres rutas generales (Leopoldini *et al.*, 2004; Marković *et al.*, 2012):

1. Transferencia de átomos de hidrógenos (HAT por sus siglas en inglés). Consiste en la transferencia simultánea de un electrón y un protón desde los

grupos hidroxilo de los antioxidantes hacia el radical libre, por lo que representa una ruptura homolítica del enlace O–H, formándose como intermediario un radical fenoxilo o semiquinona. Esta ruta de inhibición de radicales libres puede ser estudiada mediante la determinación de la entalpía de disociación de enlace (BDE por sus siglas en inglés). La reacción que la representa es la siguiente:

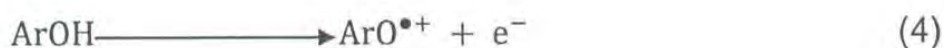


2. Secuencial pérdida de protón y transferencia de electrón (SPLET por sus siglas en inglés). Inicia con la desprotonación de la molécula antioxidante formándose un anión fenóxido como intermediario y posteriormente se da la transferencia del electrón al radical libre. La reacción se da en dos etapas y son las siguientes:



Esta ruta de inhibición de radicales libres puede ser caracterizada a partir del cálculo de la afinidad protónica del anión fenóxido (PA) y la energía de transferencia del electrón (ETE).

3. Transferencia del electrón seguida por la transferencia del protón (SET-PT por sus siglas en inglés). Inicia con la donación del electrón formándose un radical catión como intermediario y se representa mediante las siguientes reacciones:





La forma en que se puede estudiar esta ruta de inhibición de radicales libres es a partir del cálculo del potencial de ionización (IP) y la energía de disociación del protón (PDE).

La transferencia por etapas secuenciales de un electrón y un protón, como ocurre en los mecanismos SPLET y SET-PT, representa una ruptura heterolítica de los enlaces O–H. Aunque se forman aniones y radicales cationes como intermediarios, el producto final de la reacción en ambos mecanismos es un radical fenoxilo o semiquinona como sucede en el HAT.

### **3.7 Relación de la Estructura y Capacidad Antirradical de Procianidinas**

Debido a la estructura compleja de las PCs y la gran diversidad de radicales libres existentes, el estudio de la relación estructura-capacidad antirradical de las PCs es difícil y ha generado muchas controversias, especialmente en lo referente al grado de polimerización. Por una parte se afirma que a mayor tamaño de las PCs mayor actividad antioxidante (Vennat *et al.*, 1994; Arteel y Sies, 1999), pero por otro lado se indica que la actividad antioxidante incrementa de monómero a trímero y decrece a partir de tetrámero (Plumb *et al.*, 1998). Algunos autores sugieren que el medio de reacción y el tipo de radical libre son condicionantes. En este sentido se ha reportado un aumento de la capacidad antioxidante de las PCs con el grado de polimerización en sistemas acuosos y una relación inversa en la fase lipídica (Vieira *et al.*, 1996; Plumb *et al.*, 1998). Dímeros, trímeros, hexámeros y heptámeros de PCs han resultado más eficaces contra el anión superóxido que los monómeros, mientras que los tetrámeros han mostrado una mayor capacidad antioxidante frente al radical peroxinitrito (Arteel y Sies, 1999). La inhibición de radicales

hidroxilo no sigue el grado de polimerización, por un lado los trímeros mostraron ser más eficientes que los dímeros, pero menos que los monómeros (Cheynier *et al.*, 1992).

Por otra parte, el parámetro estructural menos estudiado experimentalmente por la dificultad que implica, es el de las conformaciones, ya que se requieren equipos de alta precisión y costosos. Debido a la gran importancia que las conformaciones y el grado de polimerización pueden tener en relación a la actividad química y biológica de las PCs, es necesario realizar más estudios en esta área de la investigación.

### **3.8 Métodos para Determinar la Capacidad Antirradical**

Cuando se explora el potencial antioxidante de extractos vegetales, el empleo de un solo método resulta insuficiente para proveer información de los diferentes mecanismos involucrados, ya que los fitoquímicos son compuestos multifuncionales (Frankel y Meyer, 2000). Por esta razón se han desarrollado diferentes métodos *in vitro* para medir la capacidad antirradical como parte del perfil antioxidante, entre estos están los sistemas monofásicos (soluciones) y heterofásicos (emulsiones) (Velasco *et al.*, 2002), los que se basan en mediciones espectrofotométricas a un determinado tiempo y los que siguen la reacción en el transcurso del tiempo (cinéticos).

### 3.8.1 Sistemas Monofásicos y Heterofásicos.

Los sistemas monofásicos son útiles para determinar la afinidad de los antioxidantes hidrofílicos (vitamina C), anfifílicos (PCs) y lipofílicos (vitamina E) por diferentes tipos de radicales libres y medios de reacción, en base a su polaridad. Entre estos se encuentran los ensayos de los radicales DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>. Los sistemas heterofásicos aparte de esta información pueden generar conocimiento acerca de las propiedades coloidales, las atracciones o repulsiones electrostáticas por parte de la interfase, así como la partición de reactivos y productos en las distintas fases (acuosa, lipídica e interfase) (Velasco *et al.*, 2002).

### 3.8.2 Métodos Cinéticos

Las reacciones entre radicales libres y antioxidantes ocurren a muy bajas concentraciones (micromolares o nanomolares), además que el tiempo de vida media de los intermediarios que se forman (radicales, fenoxilo, radicales cationes, etc.) son muy cortos (nanosegundos). Por esta razón, se requiere de estudios cinéticos.

Dentro de las características que debe poseer el equipo usado para este tipo de determinaciones experimentales se incluyen, precisión, sensibilidad, facilidad de operación y rapidez para evitar la pérdida de antioxidantes inestables. Los métodos de espectrofotometría de flujo retenido (stopped-flow) pueden ser de gran utilidad para este tipo de investigación, ya que se basan en mediciones de absorbancia que detectan cambios del orden de 0.002 unidades. Utilizan una curva de reacción que permite realizar simultáneamente análisis cuantitativos (a partir de cambios en absorbancia) y cualitativos (a partir de tasas constantes de reacción). Facilitando un análisis cinético diferencial de varios componentes

mezclados, lo cual es imprescindible para el estudio de extractos de tejidos vegetales (Hiromi y Kanaya, 1988).

Sin embargo, debido a que la energía y secuencia de transferencia del átomo de hidrógeno de los múltiples grupos hidroxilo presentes en los compuestos polifenólicos, difícilmente se pueden calcular a nivel experimental, es recomendable conducir estos estudios combinando métodos de cinéticas rápidas y computacionales. Adicionalmente la carencia de estándares de PCs puede ser solventada mediante la simulación de sus estructuras moleculares para el estudio de sus propiedades de reactividad intrínseca.

### 3.8.3 Métodos Computacionales

La química computacional es una disciplina que combina principios físicos y matemáticos, que al ser adaptados al lenguaje y rapidez de una computadora permiten simular eficientemente sistemas químicos, ya sea en estado sólido, líquido o gaseoso, en distintas conformaciones, evitando problemas de pureza y solubilidad. Esta constituye una herramienta complementaria a las experimentales, que estudia a niveles profundos la estructura electrónica y propiedades químicas de moléculas biológicas, generando datos confiables (Young, 2001).

Dentro de las metodologías computacionales los denominados “métodos de estructura electrónica” son los que generan datos más reproducibles de acuerdo al tamaño molecular (Foresman y Frisch, 1996; Bertran, 2000). Dichos métodos se basan en la física cuántica, por lo que toman en cuenta a los electrones y se dividen en tres clases: semiempíricos, *ab initio* y teoría de funcionales de la densidad (DFT por sus siglas en inglés).

Los métodos *ab initio* o de primeros principios (Hartree Fock y post-Hartree-Fock), se basan en la ecuación de onda de Schrödinger, toman en cuenta electrones centrales y de valencia, describiendo muy bien la estructura y procesos energéticos, pero tienen la limitante que consumen mucho tiempo de cálculo a medida que incrementa el tamaño molecular (Foresman y Frisch, 1996; Bertran, 2000).

DFT es el método computacional más versátil por el balance tiempo-costo-precisión con que permite realizar los cálculos, ya que se basa en una ecuación análoga a la ecuación de onda de Schrödinger. Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño molecular y el requerimiento en precisión, también demanda un tiempo importante comparado con los métodos semiempíricos, aunque notablemente menor comparado a los *ab initio* (Foresman y Frisch, 1996; Bertran, 2000).

Los métodos semiempíricos se basan en la ecuación de onda de Schrödinger, pero utilizan ciertas aproximaciones de la mecánica cuántica para evitar etapas computacionales intensivas, y se complementan con parámetros determinados empíricamente para obtener mejores predicciones empleando un conjunto de datos de referencia (experimentales) (Stewart, 2013). Estos métodos se enfocan en los electrones de valencia por lo que operan muy rápido, aún en moléculas muy grandes (Foresman y Frisch, 1996; Jensen, 1999). Dentro de los métodos semiempíricos el PM6 que pertenece a la familia NNDO (neglect of diatomic differential overlap) es muy preciso (Stewart, 2013). Permite obtener geometrías moleculares en el estado basal, conformaciones, momentos dipolares, calores de formación y entalpías de reacción muy precisas e incluso muy cercanas a las obtenidas por DFT en flavonoides y correlacionan altamente con cálculos experimentales de actividad antirradical (Stewart, 2007; Amić y Lučić, 2010; Mohamed, 2013).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Material Vegetal**

Se trabajó con una variedad híbrida de sorgo café proporcionada por una empresa proveedora de semillas ubicada en Los Mochis, Sinaloa, México.

### **4.2 Limpieza del Grano de Sorgo**

Se eliminó la gluma de 10 Kg de grano de sorgo para determinar el contenido de humedad y el tiempo de decorticado.

### **4.3 Determinación del Contenido de Humedad en el Grano de Sorgo**

Se utilizó el método oficial de la A.A.C.C (2000), que consiste en someter los granos en una estufa a una temperatura de 100 °C por 24 horas.

### **4.4 Obtención del Salvado de Sorgo por Decorticación y Reducción del Tamaño de Partícula**

Se emplearon 10 Kg de sorgo para obtener el salvado a través de su decorticación por abrasión a diferentes tiempos ( $\frac{1}{2}$ , 1,  $1\frac{1}{2}$ , 2 y  $2\frac{1}{2}$  min). La

decorticación se llevó a cabo en un decortificador desarrollado y operado en el Laboratorio de Silos y Molinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora. Después de decorticar, la muestra obtenida se pasó por malla fina No. 40 para determinar el tamaño de partícula.

#### **4.5 Extracción de Compuestos Fenólicos Presentes en el Salvado de Sorgo**

Se partió de 1 g de salvado de sorgo, la extracción se realizó en tubos de centrífuga con un volumen total de 15 mL de una solución de acetona/agua/ácido acético (7+2.95+0.05, mL), se sometió a agitación por 30 s en vortex y 10 min de sonicación a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 3,500 rpm por 15 min (25 °C), el sobrenadante fue evaporado en un Rotovapor BUCHI RE 121 y reconstituido con agua HPLC, la extracción se realizó siguiendo la metodología de Gu *et al.*, (2002).

#### **4.6 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales**

Se empleó la técnica propuesta por Xu y Chang, (2007), la cual se describe a continuación: se tomaron 50 µL del extracto, se le añadieron 3 mL de agua miliQ y 250 µL de solución Folin- Ciocalteu 1N, después de agitar la mezcla se dejó reposar 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 750 µL de una solución al 20% de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), se agregaron 950 µL de agua miliQ y se mantuvo a temperatura ambiente por 40 min, después de los cuales se procedió a la lectura de la reacción contra un blanco a 765 nm, en un

espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Varian Inc., Palo Alto, CA). Se realizó una curva estándar de ácido ferúlico (0.25 -1.75 mg/mL,  $r^2 = 0.9953$ ).

#### **4.7 Aislamiento de la Fracción de Procianidinas de Salvado de Sorgo a partir del Extracto Fenólico**

Se llevó a cabo en una columna sephadex LH-20 (6 x 1.5 cm) empacada manualmente y equilibrada con una mezcla de metanol/agua al 30% (v/v), durante 4 h. Se cargó el extracto fenólico en la columna y se realizó un lavado con 60 mL de agua HPLC pH=7.0, (pH neutro favorece el desprendimiento de ácidos fenólicos, Michalkiewics *et al.*, 2008), 40 mL de una mezcla de metanol/agua al 30% (v/v) (remoción de azúcares y otros fenoles) y las PCs se eluyeron con 80 mL de una mezcla de acetona/agua al 70% (v/v), siendo esta última fracción concentrada en un Rotovapor BUCHI RE 121 y reconstituida con agua HPLC para su posterior congelamiento y liofilización. El aislamiento de las PCs se realizó siguiendo la metodología de Gu *et al.* (2002).

#### **4.8 Análisis de la Fracción de Procianidinas por Espectroscopia UV-Vis**

Para la identificación de las PCs y verificar de manera preliminar la pureza con que se aisló del resto de compuestos fenólicos, se hicieron lecturas de espectroscopía UV-Vis con escaneos dentro de un rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm.

Así mismo para buscar la posible presencia de pro-3-deoxiantocianidinas, se efectuó una prueba colorimétrica basada en la técnica de Nitao *et al.* (2001). Para ello se utilizó una mezcla preparada en una porción 1:6:3 (v/v



muestra/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La muestra estaba disuelta en metanol al 50%. La mezcla se agitó por 1 min a temperatura ambiente, después se mantuvo durante 3.7 min en un baño con agitación a 50 °C y finalmente se agitó otros 2 min a temperatura ambiente. Se realizó un escaneo de lecturas de espectroscopía UV-Vis dentro de un rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm. Esta prueba también se realizó en el estándar de procianidina B1 para monitorear la reacción. En ambos análisis se empleó un espectrofotómetro Cary 60 (Varian Inc., Palo Alto, CA).

#### **4.9 Análisis de la Fracción de Procianidinas Mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros FTIR para las muestras de PCs y estándares, fueron registrados en un espectrómetro Nicolet Protege (System 460 E.S.P) FTIR spectrometer (Madison WI, USA) en pastilla de KBr. Se realizaron al menos 64 barridos con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.10 Análisis de la Fracción de Procianidinas Mediante HPLC-UV-Vis en Fase Reversa**

La identificación de PCs se realizó en un sistema HPLC (Varian, Lake Forest, CA), equipado con bomba isocrática ProStar-210, detector ProStar 325 UV-Visible y el software Galaxy DAQ Varian LC. La separación de los compuestos se efectuó en una columna fase reversa Microsorb-MV, 100-5 C18 de 250 x 4.6 mm adquirida de Varian (Lake Forest, CA). El volumen de inyección fue de 200

$\mu\text{L}$ , previa filtración de la muestra y estándares a través de filtros PVDF de 13 mm GD/X y tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$  (Whatman, USA). La elución se llevó a cabo con fases móviles de ácido fórmico en agua conteniendo 1% (v/v) (fase móvil B) y acetonitrilo (fase móvil A) a un flujo de 1 mL/min. El gradiente de elución fue el siguiente: 0-2 min 95% A y 5% B, 2-32 min 83% A y 17% B, 32-50 min 30% A y 70% B, 50-60 min 30% A y 70% B y 60-70 min 95% A y 5% B. La columna se lavó con 70% de A por 10 min y se reequilibró con 5% de la misma fase móvil durante 5 min antes de la siguiente inyección. La detección de PCs se monitoreó a 280 nm (Karonen *et al.*, 2004; Maiga *et al.*, 2007).

Para ayudar en la identificación del tipo de monómeros que constituyen a las unidades de extensión y terminales de las PCs, se llevó a cabo una reacción de catálisis ácida con floroglucinol que se describe a continuación.

#### **4.11 Análisis de Catálisis Ácida con Floroglucinol Mediante HPLC-UV-Vis en Fase Reversa**

Se tomó 0.1 mg de muestra o estándar, se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de una solución 0.1 M de ácido clorhídrico en metanol conteniendo 50 mg/mL de floroglucinol y 10 mg/mL de ácido ascórbico. La mezcla de reacción fue homogenizada y calentada a 50 °C por 20 min después de los cuales se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio acuoso 40 mM para detener la reacción (Kennedy y Jones, 2001; Esatbeyoglu *et al.* 2011). Los productos de depolimerización fueron analizados inmediatamente en un sistema HPLC-UV siguiendo la metodología de Karonen *et al.* (2004) y Maiga *et al.* (2007), ya descritas anteriormente.

La identificación de las unidades de extensión se efectuó a través de los aductos que el floroglucinol formó con estas, mientras que las unidades terminales se detectaron como monómeros de flavan-3-ols liberados, basandonos en sus tiempos de retención (Tr) que fueron establecidos durante la reacción de floroglucinolisis con el estándar de PB1, del cual se conoce su composición.

#### 4.12 Cuantificación de Procianidinas

La cuantificación de PCs en la muestra se realizó mediante los productos de la reacción de floroglucinolisis, lo cual es válido ya que (-)-epicatequina, (+)-catequina y sus respectivos aductos que forman con el floroglucinol tienen las mismas absorptividades molares como lo demostraron Kennedy y Jones, (2001).

En las fracciones de PCs sometidas a reacción con floroglucinol los aductos representaron las unidades de extensión, mientras que los monómeros de flavan-3-ols liberados representaron las unidades terminales. Se relacionaron las áreas de los picos obtenidas en los cromatogramas de HPLC-UV para los aductos y monómeros de flaván-3-ols, con diferentes concentraciones del estándar. Se empleó una curva de calibración de (+)-catequina en un rango de concentraciones de 0.01-0.1 mg/mL con  $r^2 = 0.9994$ .

El grado de polimerización promedio de la fracción de PCs de salvado de sorgo se calculó mediante la suma de aductos y monómeros de flaván-3-ols dividida entre los monómeros de flaván-3-ols, ambas cantidades expresadas en moles (Jakobek *et al.*, 2013).

#### 4.13 Cálculo del Porcentaje de Inhibición de Peroxidación Lipídica

Para esta determinación se siguió la técnica establecida por Gülçin *et al.*, (2004). Primeramente se llevó a cabo la preparación de una emulsión de ácido linoleico mezclando 320  $\mu\text{L}$  de tween 20, 310  $\mu\text{L}$  de ácido linoleico y 99.37 mL de buffer de fosfatos 0.04 M a pH 7.0, se homogenizó con un ultraturrax a 11,000 rpm durante 3 min en oscuridad. Posteriormente se elaboró una mezcla de reacción que consistió de 1 mL de la muestra, 1.5 mL de buffer de fosfato 0.04 M pH 7 y 2.5 mL de la emulsión previamente preparada. También se preparó un control y todo se incubo en oscuridad a 40 °C.

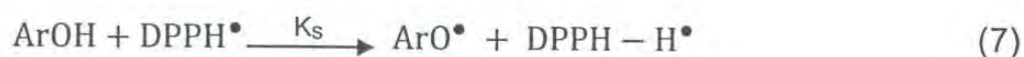
Para determinar el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica se efectuó la siguiente reacción: a 4.85 mL de etanol al 75% (v/v), se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción incubada a 40 °C y 50  $\mu\text{L}$  de tiocianato de amonio al 30%; se agitó y después de 3 min se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de cloruro ferroso 0.02 M disuelto en una solución de ácido clorhídrico al 3.5% (v/v). Se leyó inmediatamente la absorbancia a 500 nm. Se aplicó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de inhibición de la muestra.

$$IP\% = \left( \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100 \quad (6)$$

$A_0$  = absorbancia del control y  $A_t$  = absorbancia de la muestra

#### 4.14 Inhibición del Radical DPPH• Mediante el Cálculo de Tasas Constantes de Segundo Orden

El estudio de inhibición del radical DPPH• se efectuó a través del cálculo de las tasas constantes de segundo orden ( $K_s$ ). Para ello se siguieron las reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno (HAT), desde los polifenoles (ArOH) presentes en el extracto fenólico, las PCs de salvado de sorgo y algunos de sus estándares hacia el radical DPPH• (Mendoza *et al.*, 2013). Debido a que más de un átomo de hidrógeno puede ser transferido durante la reacción se consideraron las siguientes reacciones:



Los datos cinéticos de las reacciones establecidas anteriormente se obtuvieron en un sistema para cinéticas rápidas de flujo retenido, (Stopped-flow Spectrometer), modelo SX20 (Applied photophysycs Ltd, UK), equipado con una celda de 20  $\mu\text{L}$ , con un tiempo de vida muerta de 1 milisegundo. La concentración del radical DPPH• utilizada fue de  $6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$  y para las PCs y estándares se analizaron las cinéticas a distintas concentraciones (10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ). Tanto las muestras como el DPPH• fueron utilizados en solución de etanol 95%, las determinaciones fueron realizadas mezclando volúmenes iguales de éstos.

Las reacciones mostradas anteriormente fueron estudiadas bajo condiciones de pseudo-primer orden ( $K_{\text{obs}}$ ). El potencial antioxidante de la muestra da como resultado el decaimiento en la absorción del radical DPPH• medido a 515 nm, todo esto basándose en el siguiente modelo (Kakiuchi *et al.*, 2009).

$$-\frac{d}{dt}[\text{DPPH}^\bullet] = K_{\text{obs}}[\text{DPPH}^\bullet] = K_s[(\text{ArOH})_n][\text{DPPH}^\bullet] \quad (9)$$

Para el desarrollo del modelo, primeramente se realizó una estimación inicial donde los valores experimentales de concentración de DPPH<sup>•</sup> fueron transformados a logaritmo natural (ln) y ajustados a un modelo de regresión lineal, dando como resultado el valor de DPPH<sup>•</sup> a tiempo cero (DPPH<sup>•</sup><sub>0</sub>) y K<sub>obs</sub>. Con la finalidad de obtener una mejor linealidad los valores de DPPH<sup>•</sup><sub>0</sub> y K<sub>obs</sub> fueron utilizados en una segunda transformación, empleando la siguiente ecuación (Espín *et al.*, 2000).

$$[\text{DPPH}^\bullet] = [\text{DPPH}^\bullet]_0 e^{-K_{\text{obs}} t} \quad (10)$$

Finalmente, la constante de velocidad de segundo orden (K<sub>s</sub>) fue obtenida mediante una regresión lineal del parámetro K<sub>obs</sub>, el cual depende de la concentración de la muestra, donde la pendiente representa el valor de K<sub>s</sub>.

#### 4.15 Determinación de la Inhibición del Radical ABTS<sup>•+</sup> Mediante el Ensayo TEAC

Para este análisis se empleó la metodología establecida por Pellegrini *et al.*, (2003). La cual se basa en medir la habilidad del antioxidante para desactivar al radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). Dicha medición fue comparada con la capacidad del Trolox, análogo de la vitamina E, y expresado como TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidante Capacity). El valor TEAC se define como el número de milimoles de Trolox que tienen el mismo porcentaje de inhibición que un gramo de muestra.

El radical catiónico se generó por la reacción de una solución ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM). La mezcla se mantuvo en oscuridad y

temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Posteriormente se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0.70 ( $\pm 0.02$ ) a 734 nm. Para la medición de las muestras se colocó 1.32 mL del radical ABTS<sup>•+</sup> con 10  $\mu$ L de muestra, la reacción fue monitoreada hasta los 6 minutos. La adición de antioxidantes sobre el catión radical lo reduce a ABTS, dando como resultado una decoloración. El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60.

#### 4.16 Cálculos Computacionales

Para dibujar las estructuras moleculares se utilizaron los programas Avogadro y GaussView 5.0 y para los cálculos de las propiedades el paquete computacional GAUSSIAN 09, empleando el método semiempírico PM6 (Frisch *et al.*, 2004).

Todos los cálculos se efectuaron en fase de gas, se inició con la optimización de geometrías y frecuencias vibracionales de las moléculas neutras para establecer su estado de mínima energía y las conformaciones correspondientes. Posteriormente se estimaron las propiedades antirradicales dentro de las que se incluyeron potencial de ionización (IP) y entalpía de disociación de enlace (BDE). Adicionalmente se determinaron las estabilidades energéticas de los intermediarios que usualmente se forman durante las reacciones antirradicales de las PCs, como son radicales cationes al donar electrones y radicales fenoxilo al donar átomos de hidrógeno.

El Potencial de ionización (PI), se determinó como la diferencia de energía entre el radical catión  $E_{(+1)}$  que se forma al transferir un electrón y la molécula neutra  $E_{(0)}$ .

$$IP = E_{(+1)} - E_{(0)} \quad (11)$$

La entalpía de disociación de enlace (BDE), se calculó como la diferencia de entalpía entre la molécula neutra (ArOH) y su radical (ArOH<sup>•</sup>), después de la remoción del átomo de hidrógeno (H<sup>•</sup>), basados en la siguiente ecuación:

$$BDE = H(\text{ArOH}^{\bullet}) + H(\text{H}^{\bullet}) - H(\text{ArOH}) \quad (12)$$

La estabilidad energética se estimó como un delta de energía entre la molécula neutra y cada uno de los intermediarios formados (radicales cationes, radicales fenoxilo).

#### 4.17 Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Debido al tipo de variables estudiadas, en algunos de los datos generados experimentalmente, se reportaron las desviaciones estándar. Únicamente en los análisis de regresión lineal y no lineal efectuados para el cálculo de las  $K_{\text{obs}}$  y  $K_{\text{s}}$ , se empleó el paquete estadístico NCCS (NCSS, 2007), reportándose el error estándar correspondiente.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Contenido de Humedad de los Granos de Sorgo

Se encontró un contenido de humedad para los granos de sorgo de 10.30 %, por lo que se consideró que esta humedad fue suficiente para proceder a decorticar sin previo acondicionamiento de los mismos.

### 5.2. Contenido de Compuestos Fenólicos en las Fracciones de Salvado de Sorgo

Como se puede visualizar en la Tabla 1, el mayor contenido de compuestos fenólicos se obtuvo en la fracción de salvado de sorgo que se decortizó durante 1½ min, alcanzando una concentración de 18.72 mg EAF/g salvado. Este resultado se encuentran dentro del rango reportado por Awika *et al.* (2005), para dos variedades de sorgo café (sumac 22.5 mg EAG/g y SC103 13.5 mg EAG/g). Con base en este resultado, la fracción de salvado que se decortizó por 1½ min fue la que se seleccionó para obtener el extracto fenólico a partir del cual se aislaron las PCs.

**Tabla 1.** Concentración de compuestos fenólicos en las fracciones de salvado de sorgo obtenidas por decorticación a diferentes tiempos.

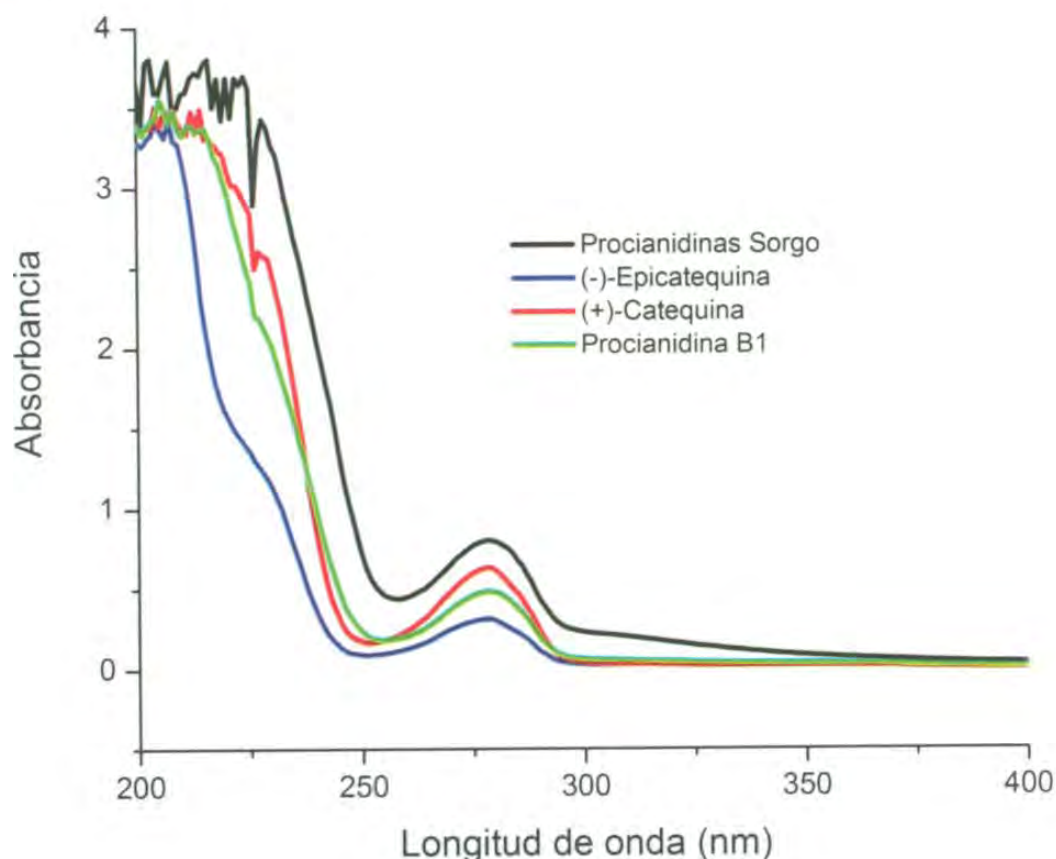
| Tiempo de decorticación (min) | Concentración mg EAF/g salvado |
|-------------------------------|--------------------------------|
| ½                             | 5.81                           |
| 1                             | 15.25                          |
| 1 ½                           | 18.72                          |
| 2                             | 18.62                          |
| 2 ½                           | 13.59                          |

EAF = equivalentes de ácido ferúlico.

## 5.3 Identificación de la Fracción de Procianidinas

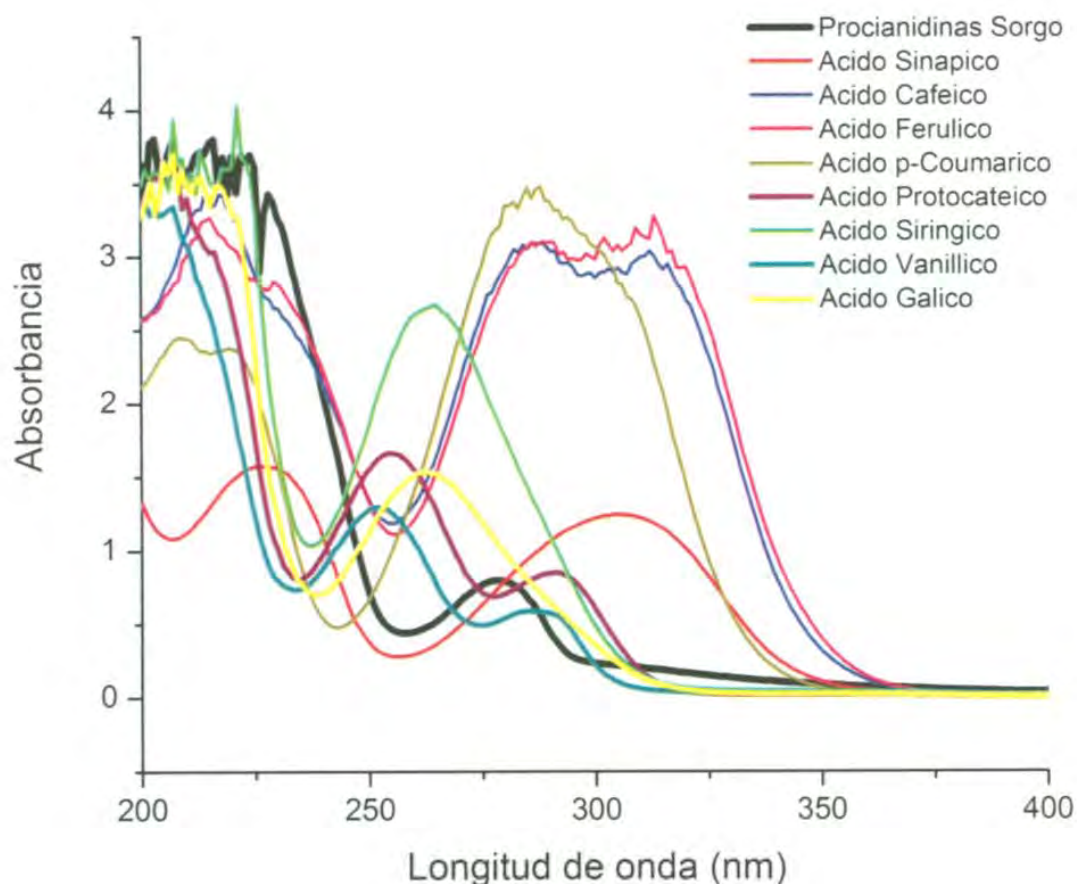
### 5.3.1 Análisis de Espectroscopía UV-Vis

En la Figura 5, se observa el espectro UV-Vis de la fracción de PCs extraídas del salvado de sorgo, el cual muestra el mismo comportamiento y regiones de máxima absorbancia que los estándares de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B1 empleados como referencia. A los 280 nm se detectó el pico distintivo de los flavan-3-ols y PCs, lo que corrobora que la fracción de PCs fue aislada con pureza del resto de compuestos fenólicos presentes en el salvado de sorgo.



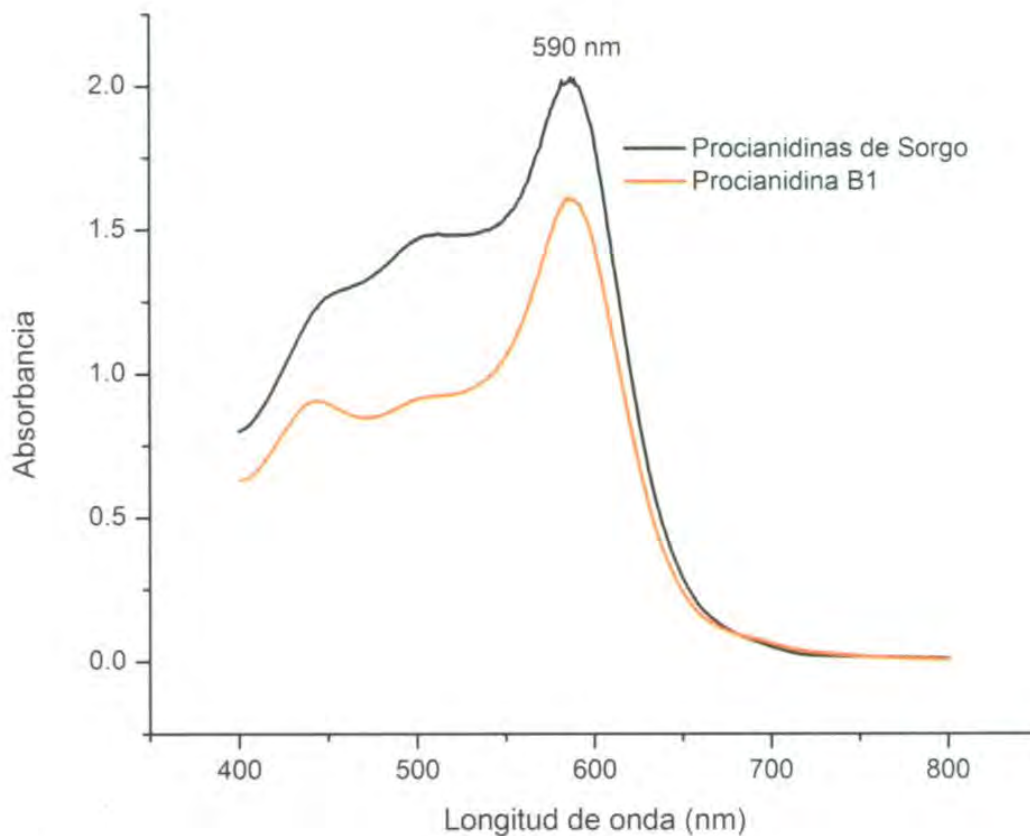
**Figura 5.** Espectros UV-Vis de la fracción de PCs extraída de salvado de sorgo y estándares de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B1.

Debido a que el salvado de sorgo es rico en ácidos fenólicos y estos pudieran ser extraídos junto con las PCs, se efectuó una comparación de los espectros UV-Vis de los ácidos fenólicos más abundantes en sorgo con la fracción de PCs aislada, para descartar su presencia. En la Figura 6, se puede apreciar que los ácidos fenólicos que presentan región de traslape con las PCs son el caféico que muestra dos picos máximos a los 288 y 313 nm, ferúlico a los 290 y 313 nm, y *p*-coumárico a 287 nm. Sin embargo, las bandas de los ácidos fenólicos son muy anchas y generalmente de mayor intensidad de absorción que las PCs, por lo que se descarta su presencia en la fracción de PCs de salvado de sorgo.



**Figura 6.** Espectros UV-Vis de la fracción de PCs extraída de salvado de sorgo y estándares de ácidos fenólicos.

El análisis que se realizó en la mezcla de ácido sulfúrico-metanol para detectar pro-3-deoxiantocianidinas, fue muy útil para descartar su presencia y a la vez corroborar que la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo estaba constituida por monómeros y oligómeros de (-)-epicatequina y (+)-catequina. La Figura 7, muestra los espectros UV-Vis de la fracción de PCs y el estándar de procianidina B1 usado como referencia. En ambos espectros se observaron dos pequeños hombros a los 444 nm y 506 nm y un pico a los 590 nm que es confirmativo de las PCs y no de pro-3-deoxiantocianidinas, las cuales con esta prueba revelan su presencia en la región de 470 – 498 nm, de acuerdo con Devi *et al.* (2011) y Nitao *et al.* (2001).



**Figura 7.** Espectros UV-Vis de la fracción de PCs extraída de salvado de sorgo y el estándar de procianidina B1 en mezcla de ácido sulfúrico-metanol.

### 5.3.2 Análisis de Espectroscopía IR

Con la finalidad de verificar la pureza de la fracción de PCs aislada del salvado de sorgo también se efectuó un análisis de espectroscopía IR.

De acuerdo con varios autores la región de frecuencias más importante para la identificación de las PCs es la comprendida de  $1,800-700\text{ cm}^{-1}$  (Foo, 1981; Passos *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012).

En la Figura 8, se muestran los espectros IR correspondientes a la fracción de PCs aisladas del salvado sorgo y el estándar de procianidina B1 empleado como referencia. Debido a la similitud en sus espectros IR, las bandas que los constituyen y sus respectivas vibraciones se describen en forma conjunta.

**$1950-1650\text{ cm}^{-1}$** . Patrones de disustitución orto de anillos bencénicos.

**$1630-1440\text{ cm}^{-1}$** . Estiramientos C=C de los anillos aromáticos A y B.

**$1329-1170\text{ cm}^{-1}$** . Representa la región distintiva de las PCs y está descrita por un pico entre  $1282-1284\text{ cm}^{-1}$  y tres picos cercanos a  $1323$ ,  $1226$  y  $1169\text{ cm}^{-1}$ . Estas frecuencias se asocian con estiramientos C–O y C–C principalmente.

**$1200-900\text{ cm}^{-1}$** . 1,2-disustitución de anillos aromáticos.

**$1100-700\text{ cm}^{-1}$** . 1,3-disustitución de anillos aromáticos.

El grupo catecol del anillo B y el enlace interflaván representan 1,2-disustituciones y el grupo resorcinol del anillo A representa 1,3-disustitución.

**$900-600\text{ cm}^{-1}$** . Indican en conjunto balanceos de enlaces C–H, deformación de enlaces O–H y de los anillos.

**$828-820\text{ cm}^{-1}$** . Representa sustitución meta, lo que evidencia la presencia del grupo resorcinol del anillo A (5–OH y 7–OH).

**$780-730\text{ cm}^{-1}$** . Se relaciona con sustitución orto, lo que confirma la presencia del grupo catecol en el anillo B.

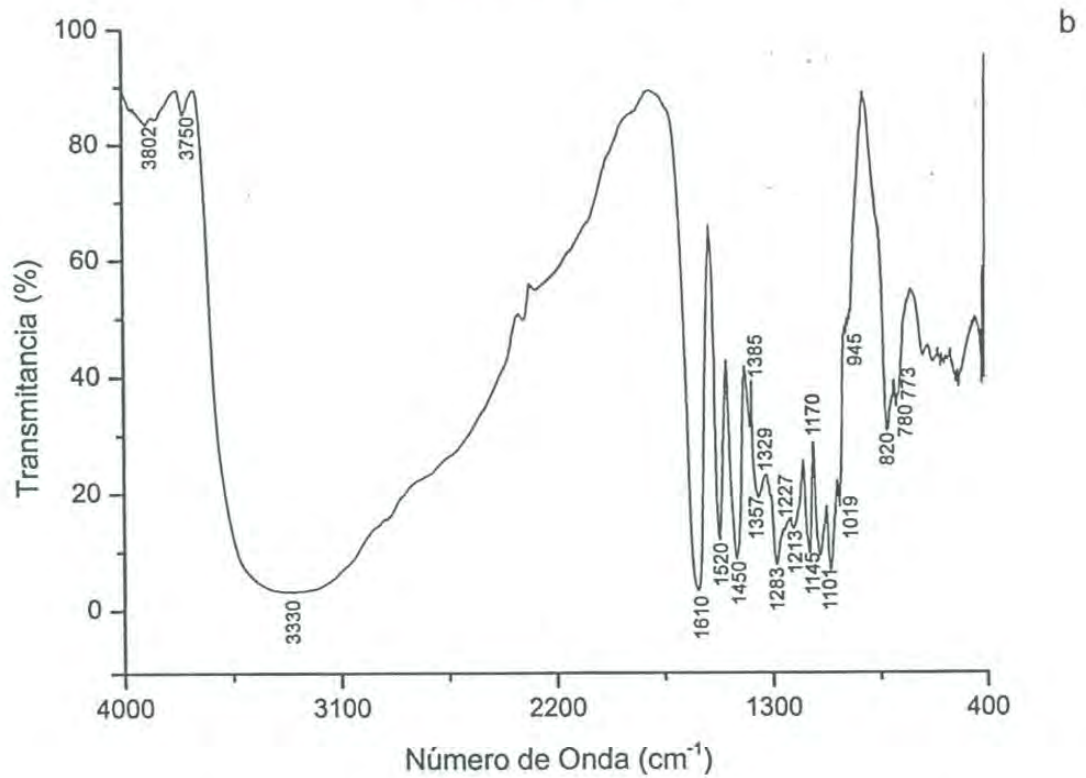
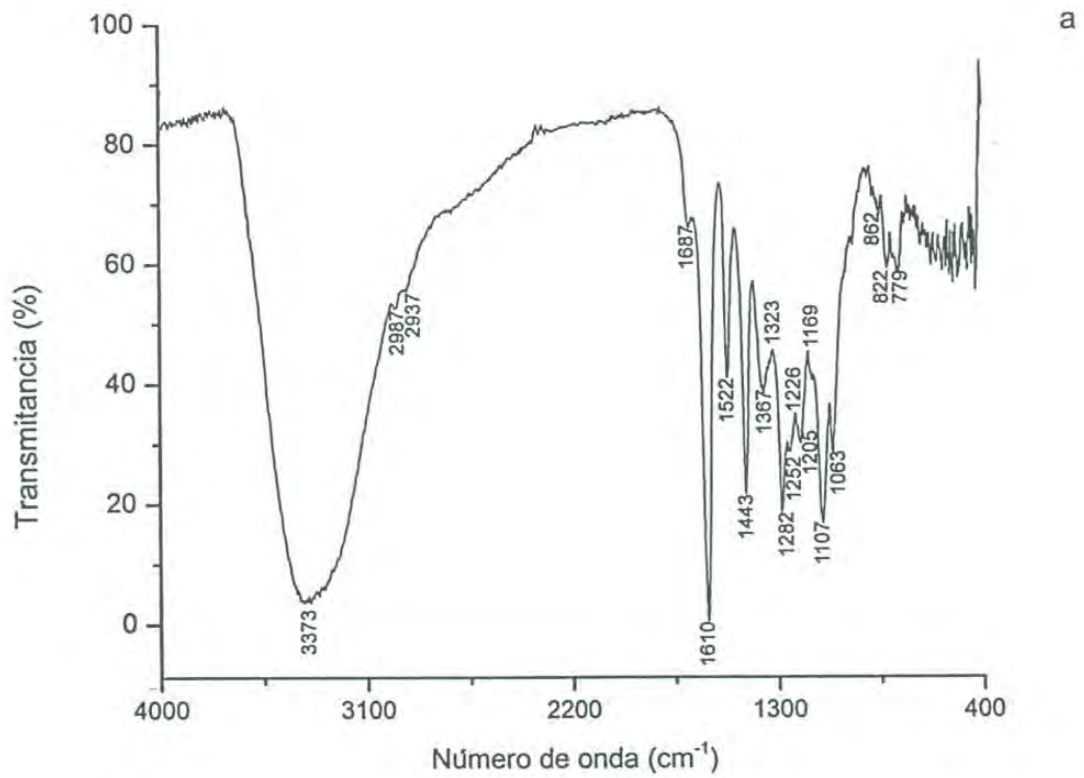


Figura 8. Espectros IR de la fracción de PCs aislada del salvado de sorgo (a) y el estándar de procianidina B1 (b).

También se compararon los espectros IR de la fracción de PCs aislada del salvado de sorgo con los estándares de ácidos fenólicos más abundantes en sorgo, con la finalidad de corroborar que estos no se extrajeron junto con las PCs.

En la Figura 9, se puede visualizar de manera general que los ácidos fenólicos presentaron varias bandas fuertes y bien definidas en la región de 1703–1645  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a los estiramientos del grupo ceto (C=O) que forma parte de su grupo carboxilo (OH–C=O) (Lambert *et al.*, 1998). Dichas bandas intensas no se detectaron en la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo por lo que se corrobora la ausencia de ácidos fenólicos como una impureza.

### 5.3.3 Análisis HPLC-UV-Vis en Fase Reversa

En la Figura 10, se muestran los cromatogramas HPLC-UV-Vis en fase reversa del extracto fenólico completo y la fracción de PCs aislados de salvado de sorgo, así como una mezcla de estándares de ácidos fenólicos, monómeros y dímeros de PCs. El cromatograma correspondiente al extracto fenólico completo (10 a) indica la presencia de ácido gálico (AG), ácido protocateico (AP), procianidina B1 (PB1), (+)-catequina (C), ácido caféico (AC), ácido vanílico (AV), ácido siríngico (ASg), (-)-epicatequina (E), ácido *p*-coumárico, ácido ferúlico (AF), ácido sinápico (ASi) y oligómeros de PCs con grado de polimerización  $\geq 8$ . Estos compuestos fueron identificados por medio de los tiempos de retención de sus respectivos estándares, mientras que los oligómeros de mayor tamaño ( $\geq 8$ ) se determinaron mediante floroglucinólisis, como se explicará más adelante.

En el cromatograma correspondiente a la fracción de PCs (10 c) claramente se visualiza que los ácidos fenólicos fueron eliminados. También se aprecia que la

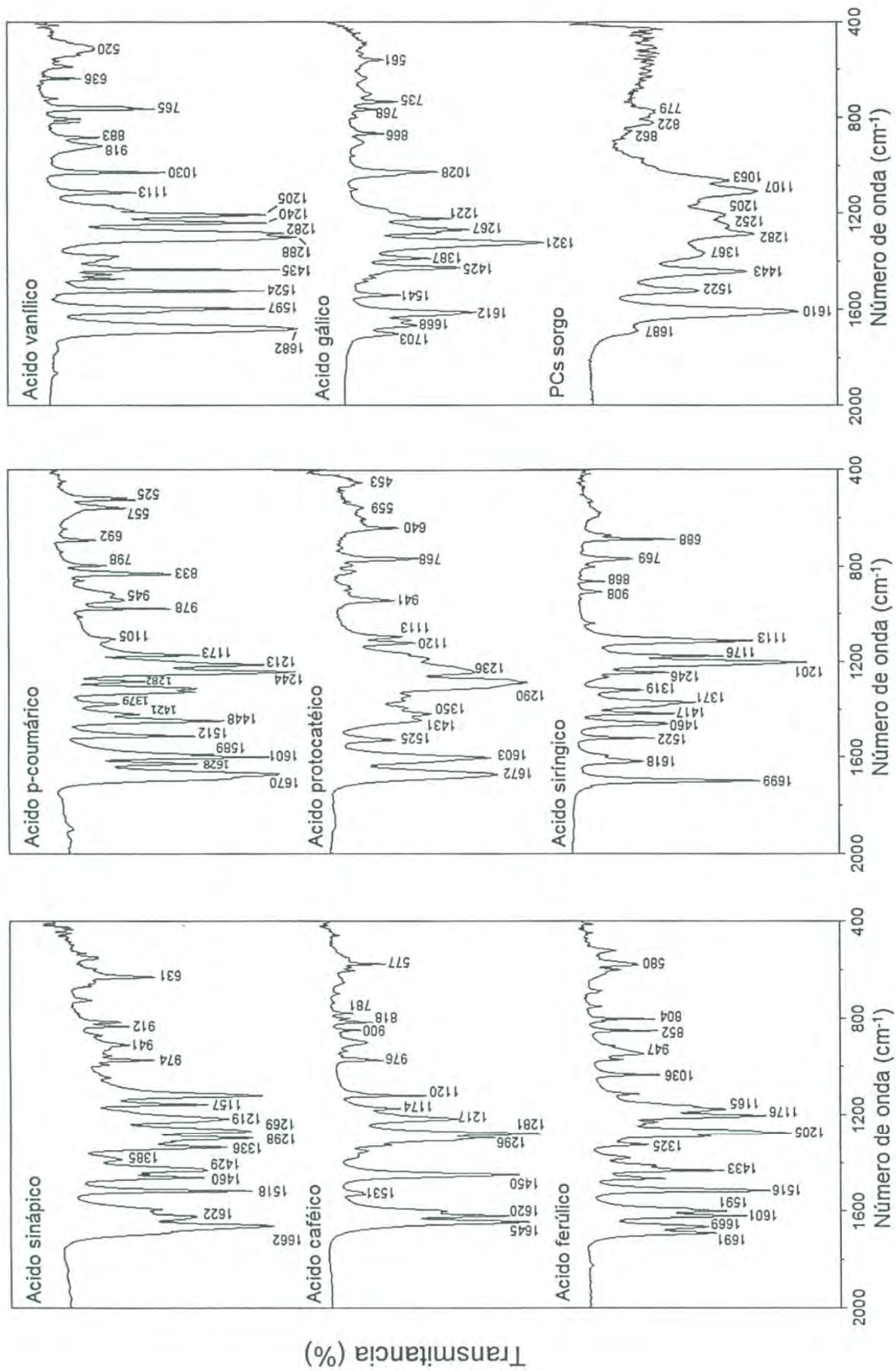
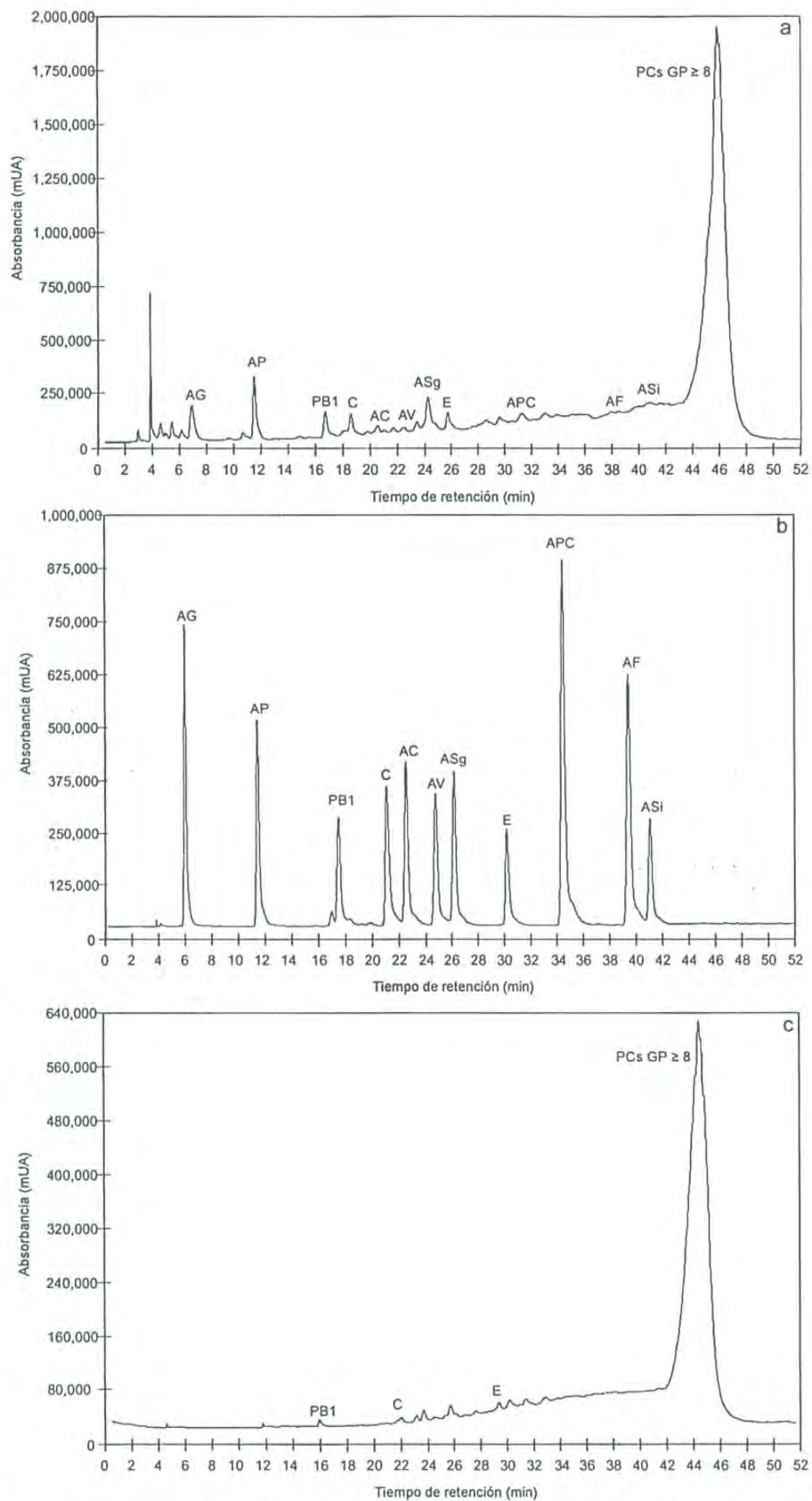


Figura 9. Espectros IR de la fracción de PCs de salvado de sorgo y estándares de ácidos fenólicos.





**Figura 10.** Cromatogramas HPLC-UV-Vis en fase reversa del extracto fenólico completo (a), mezcla de estándares de ácidos fenólicos y PCs (b) y la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo (c).

procianidina B1, (+)-catequina y (-)-epicatequina están presentes en pequeñas cantidades en comparación con los oligómeros con grado de polimerización  $\geq 8$ . Debido a que no se tuvo disponibilidad a otros estándares de PCs no se pudieron identificar los otros pequeños picos que se obtuvieron en el transcurso de los 4-35 min de la corrida cromatográfica. Al respecto se sugiere estos pueden pertenecer a oligómeros que van desde dímeros a heptámeros. Esto con base en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación en otros extractos vegetales, en el cual se usó la misma columna, condiciones cromatográficas y equipo, con la variante de emplear un detector de masas además del UV-Vis.

#### **5.3.4 Análisis de Cátalisis Ácida con Floroglucinol Mediante HPLC-UV-Vis en Fase Reversa**

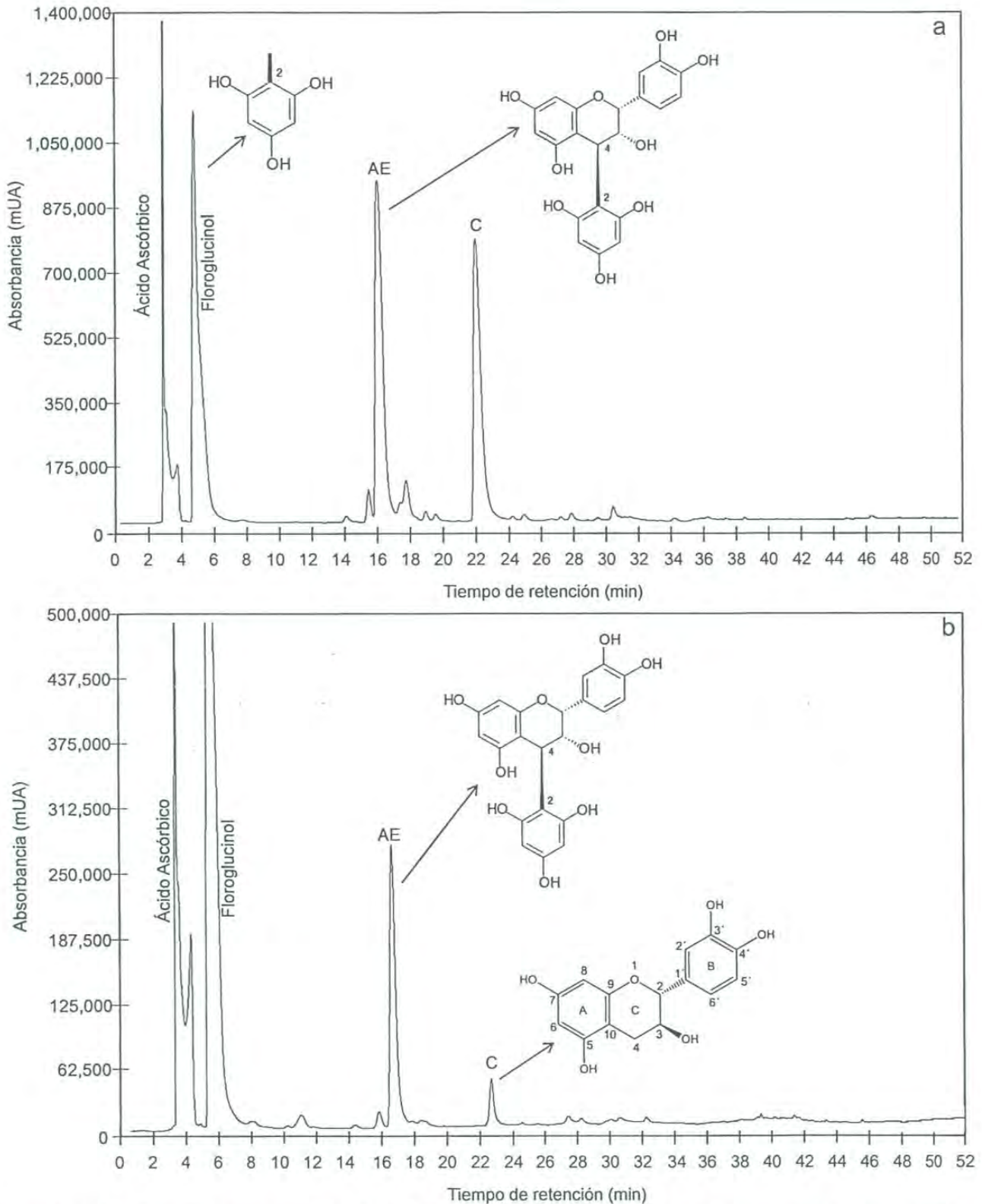
La carencia de estándares comerciales de oligómeros de PCs con grado de polimerización  $\geq 4$ , dificulta su identificación y cuantificación en los extractos vegetales, por lo que es usual recurrir a las reacciones de depolimerización mediante catálisis ácida en la presencia de un reactivo nucleofílico para ayudar en esta tarea.

Debido a las condiciones ácidas (pH 1-2) empleadas en estas reacciones, los enlaces interflaván se rompen fácilmente generando carbocationes a partir del C4 de las unidades de extensión, los cuales son capturados por un nucleófilo para formar aductos, mientras que la unidad terminal se libera intacta como flavan-3-ol (Foo y Karchesy, 1989; Kennedy y Jones, 2001). Los reactivos nucleófilos más utilizados son el floroglucinol y el bencilmercaptano, ambos han demostrado buenos resultados en la depolimerización de PCs (Geissman y Yoshimura 1966; Jurd, 1967; Thompson *et al.*, 1972). El uso del floroglucinol como reactivo nucleófilo tiene ventajas sobre el bencilmercaptano; entre las que resaltan la característica de ser un compuesto inodoro que no requiere manipulación especial, y por otro lado presenta más selectividad en la formación de aductos 3-4 *trans* que son más fácilmente detectables

a través de HPLC (Hemingway, 1989). Por esta razón en el presente trabajo se utilizó floroglucinol.

Para monitorear los productos de depolimerización de una muestra y hacer una identificación correcta de las PCs presentes, es conveniente trabajar primero con los estándares disponibles. Bajo este contexto se empleó el estándar de PB1. Se trabajó con las condiciones establecidas por Kennedy y Jones, (2001), a 50 °C por 20 min. En estas condiciones se logró la completa depolimerización de PB1 obteniéndose los siguientes productos: un aducto de (-)-epicatequina formado desde su unidad de extensión con el floroglucinol y también su unidad terminal libre en su forma de (+)-catequina.

La fracción de PCs de salvado de sorgo mostró un comportamiento similar al estándar de PB1, como puede apreciarse en la Figura 11 a,b. La formación del aducto de (-)-epicatequina indica que las unidades de extensión de los oligómeros detectados estaban constituidas por (-)-epicatequina, tal como el estándar de PB1. Mientras que la liberación de monómeros de (+)-catequina sugiere que estas constituyen las unidades terminales y están enlazadas principalmente por uniones interflaván del tipo C4 $\beta$ →C8. Esta afirmación se fundamenta en que las uniones interflaván C4→C8 se rompen fácilmente y pueden llegar a degradarse en su totalidad, mientras que las tipo C4→C6 son más resistentes a la catálisis ácida (LeRoux *et al.*, 1998; Esatbeyoglu *et al.*, 2011).



**Figura 11.** Cromatogramas HPLC-UV en fase reversa de los productos formados en la reacción de floroglucinólisis del estándar de PB1 (a) y la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo (b) a 50 °C durante 20 min.

## 5.4 Cuantificación de Procianidinas

Al aislar la fracción de PCs se lograron extraer 11.50 mg/g de los 18.72 mg/g de compuestos fenólicos presentes en el salvado de sorgo. Esto significa que la fracción de PCs representó el 61.43% de los fenoles totales.

Los oligómeros con grado de polimerización  $\geq 8$  se encontraron en una concentración de 11.06 mg/g (59.05%), Procianidina B1 de 0.0541 mg/g (0.29%), (+)-catequina de 0.02764 mg/Kg (0.15%), (-)-epicatequina de 0.0260 mg/g (0.14%) y las PCs no identificadas representaron una cantidad de 0.3373 mg/g (1.80%).

Por la concentración relativa de cada oligómero se encontró que la fracción de PCs aislada de salvado de sorgo tuvo un grado de polimerización promedio de 8.86, es decir de nonámero. Además se determinó que dichos oligómeros estaban constituidos por 89% de (-)-epicatequina como unidades de extensión y 11% de (+)-catequina como unidad terminal. Estos resultados son similares a los reportados por Gu *et al.* (2003), quienes reportaron una composición de 88.2% de (-)-epicatequina como unidad de extensión y 9.3% de (+)-catequina como unidad terminal para PCs de salvado de sorgo café (sumac). Además encontraron un grado de polimerización promedio para las PCs de 8.4.

## 5.5 Porcentaje de Inhibición de Peroxidación Lipídica

Los hidroperóxidos son compuestos reactivos que se forman en procesos oxidativos y conducen a la generación de radicales libres a nivel de la membrana celular y en las matrices alimentarias, a partir de ácidos grasos abundantes y susceptibles a la oxidación como lo es el ácido linoléico (García *et al.*, 2010). Por esta razón, la determinación de inhibición de peroxidación lipídica en un sistema de emulsión con

ácido linoléico, puede brindar información acerca de la capacidad que tienen los compuestos fenólicos y PCs para ejercer actividad antirradical en sistemas heterofásicos que simulan las fases polares y no polares de membranas y matrices alimentarias.

Este ensayo se determinó a la concentración de 0.50 mg/mL. Como se aprecia en la Tabla 2, tanto el extracto fenólico como la fracción de PCs mostraron una tendencia a incrementar el porcentaje de inhibición en el transcurso del tiempo de incubación a 40 °C. Ambos mostraron valores altos, sin embargo el extracto fenólico mostró porcentajes de inhibición un poco mayores alcanzando su máximo a las 72 h, el cual fue de 94.04% y en el caso de la fracción de PCs fue 91.64%. Aunque el mayor interés de este trabajo se centra en la fracción de PCs, también se incluyeron los análisis del extracto fenólico para efectos de comparación y conocer las interacciones que pudieran tener las PCs con otros compuestos fenólicos presentes en el salvado de sorgo al momento de actuar como inhibidores de radicales libres.

Los niveles de inhibición de peroxidación lipídica obtenidos para el extracto fenólico y la fracción de PCs de salvado de sorgo, en este estudio, resultaron superiores al 68.2% reportado en cáscara de trigo, 70.7% en salvado de trigo, 72.5% para mazorca de maíz, 69.5% del salvado de arroz y 64.8% de la cáscara de arroz (Sultana *et al.*, 2008). Estos resultados son importantes, ya que sitúan al salvado de sorgo como un tejido con gran capacidad para proteger de la oxidación al ácido linoleico.

Con la finalidad de determinar la posible contribución individual de monómeros y dímeros de PCs, se calcularon los porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica en algunos de sus estándares. Claramente se visualiza en la Tabla 2, que los dímeros como PB1 (96.25%), tienen mayor contribución que los monómeros como (+)-catequina (89.93%).

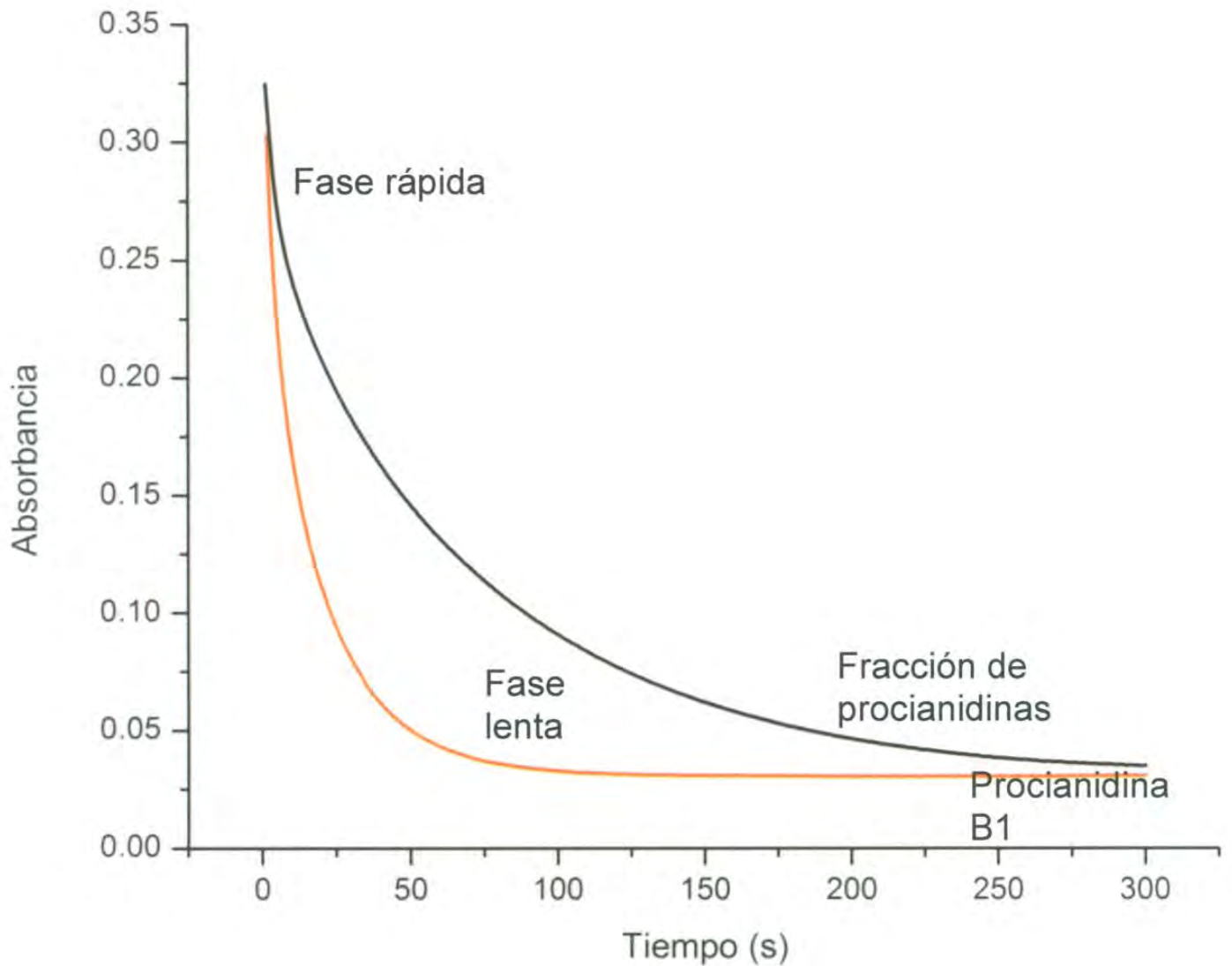
**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica en una emulsión de ácido linoleico del extracto fenólico, fracción de procianidinas y estándares de fenoles presentes en salvado de sorgo.

| Extracto o estándar<br>(0.50 mg/mL) | Inhibición de peroxidación lipídica (%) |       |       |
|-------------------------------------|---|-------|-------|
|                                     | 24 h                                    | 48 h  | 72 h  |
| Extracto fenólico                   | 81.81                                   | 82.78 | 94.04 |
| Fracción procianidinas              | 72.31                                   | 83.20 | 91.64 |
| (+)-Catequina                       | 78.89                                   | 83.39 | 89.93 |
| Procianidina B1                     | 85.19                                   | 85.70 | 96.25 |

### 5.6 Inhibición del Radical DPPH<sup>•</sup> Mediante el Cálculo de Tasas Constantes de Segundo Orden

En la Figura 12, se muestra que las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno del extracto fenólico y fracción de PCs de salvado de sorgo, así como los estándares de PCs, ocurren en dos etapas cinéticas: una rápida y otra lenta. Un comportamiento similar a éste ha sido reportado en estudios previos para otros extractos fenólicos, estándares de flavonoides y fenoles en general (Foti *et al.*, 2008; Sendra *et al.*, 2007; Tsimogiannis *et al.*, 2006; Espín *et al.*, 2000; Mendoza *et al.*, 2013).

En la etapa rápida ocurre la primera transferencia del átomo de hidrógeno, la cual puede marcar la diferencia en el curso de la reacción global (fase rápida + fase lenta) y en la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos y sus mezclas.



**Figura 12.** Comportamiento cinético en la reacción de la fracción de procianidinas de salvado de sorgo y el estándar de procianidina B1 con  $\text{DPPH}^\bullet$   $6.25 \times 10^{-5}$  M, en etanol al 95% a temperatura ambiente.

En la Tabla 3 se muestran las  $K_s$  calculadas en este estudio. La etapa rápida monitoreada durante los primeros 5 s marcó una clara diferencia entre muestras y estándares. Un resultado que no se esperaba fue que el extracto fenólico completo mostró valores de  $K_s$  notablemente mayores  $2650 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1} \text{s}^{-1}$  que la fracción de PCs  $1640 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1} \text{s}^{-1}$ .



Es conocido que las reacciones de inhibición del radical DPPH<sup>•</sup> operan a través de los mecanismos HAT y SPLET (Tourinho, *et al.*, 2005). Debido a las condiciones ácidas del medio de reacción empleado en este estudio (pH cercano a 5), el mecanismo SPLET podría favorecerse en los ácidos fenólicos presentes en el extracto fenólico de salvado de sorgo, ya que tienen bajos pK (3-4). En estas condiciones los ácidos fenólicos podrían desprotonarse y seguir la ruta de formación de aniones fenóxido, lo cual no se favorece en las PCs por su elevado pK cercano a 9.5.

**Tabla 3.** Tasas constantes de segundo orden de la fase rápida y la reacción global del extracto fenólico, la fracción de procianidinas de salvado de sorgo y estándares frente al radical DPPH<sup>•</sup>.

| Extracto o estándar    | Fase rápida (5 s) | Fase rápida + fase lenta (300 s)              |
|------------------------|-------------------|---|
|                        |                   | $K_s$ ( $\mu\text{g/mL}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) |
| Extracto fenólico      | 2650              | 190   |
| Fracción procianidinas | 1640              | 120   |
| (+)-Catequina          | 790               | 82  |
| Procianidina B1        | 6870              | 83  |

Los errores estándar se mantuvieron muy bajos en el orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ , por lo que no se reportaron.

En lo que respecta a los estándares, el dímero de procianidina B1 presentó valores de  $K_s$  significativamente más altos que el monómero (+)-catequina, 6870 y 790 ( $\mu\text{g/mL}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), respectivamente, lo que sugiere la importancia del grado de polimerización en la actividad antirradical.

La reacción global se monitoreó durante 300 s y se observó que cuando inicia la fase lenta, la  $K_s$  disminuye considerablemente, lo cual puede deberse a que en esta etapa se presentan reacciones secundarias que resultan en mezclas de productos de oxidación (Foti *et al.*, 2008; Sendra *et al.*, 2007; Tsimogiannis *et al.*, 2006). Aún así la mayor  $K_s$  en esta etapa de la reacción antirradical la presentaron el extracto fenólico y la fracción de PCs con 190 y 120 ( $\mu\text{g/mL}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), respectivamente.

## 5.7 Inhibición del Radical ABTS<sup>•+</sup> Mediante el Ensayo TEAC

A diferencia del análisis de inhibición de peroxidación lipídica y las cinéticas con el radical DPPH<sup>•</sup>, la efectividad de la fracción de PCs se manifestó durante la reacción inhibitoria del radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>. En este ensayo se encontraron valores de 3.81 y 2.22 mmol Eq Trolox g<sup>-1</sup> muestra, para las PCs y el extracto fenólico, respectivamente (Tabla 4).

El ensayo de inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> opera a través de los mecanismos SET-PT y HAT. Estudios experimentales y computacionales han sugerido que el mecanismo SET-PT puede favorecerse en las PCs, pero no en los ácidos fenólicos (Tourinho *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2013), lo cual podría explicar porque la fracción de PCs resultó más efectiva.

No obstante, tanto la fracción de PCs como el extracto fenólico de salvado de sorgo mostraron mayor capacidad para inhibir el radical ABTS<sup>•+</sup> que otras variedades de sorgo, galletas y pan reportados en otros trabajos, como se puede corroborar en la Tabla 4.

T. 150076

**Tabla 4.** Inibición del radical ABTS<sup>•+</sup> por el extracto fenólico y la fracción de procianidinas de salvado de sorgo mediante el ensayo TEAC.

| Extracto                                 | TEAC <sub>ABTS<sup>•+</sup></sub><br>(mmol TEAC/ g muestra) |
|--|---|
| Extracto fenólico                        | 2.22 ± 0.75   |
| Fracción procianidinas                   | 3.81 ± 0.75   |
| Grano completo sorgo                     | 0.19 <sup>a</sup>   |
| Salvado de sorgo                         | 0.60 <sup>a</sup>   |
| Salvado de sorgo PAN 3860<br>(40% grano) | 0.47 <sup>b</sup>   |
| Salvado de sorgo PAN 3860<br>(10% grano) | 1.36 <sup>b</sup>   |
| Sorgo café sumac (SU99)<br>grano         | 0.23 <sup>c</sup>   |
| Salvado SU99                             | 0.77 <sup>c</sup>   |
| Pan 30% salvado SU99                     | 0.11 <sup>c</sup>   |
| Galleta 30% salvado SU99                 | 0.13 <sup>c</sup>   |

<sup>a</sup> Valores TEAC obtenidos por (Sikwese *et al.*, 2007); <sup>b</sup> Valores TEAC obtenidos por (Duodu *et al.*, 2007); <sup>c</sup> Valores TEAC obtenidos por (Awika & Rooney, 2003)

## 5.8 Cálculos Computacionales

### 5.8.1 Optimización de la Geometría Molecular

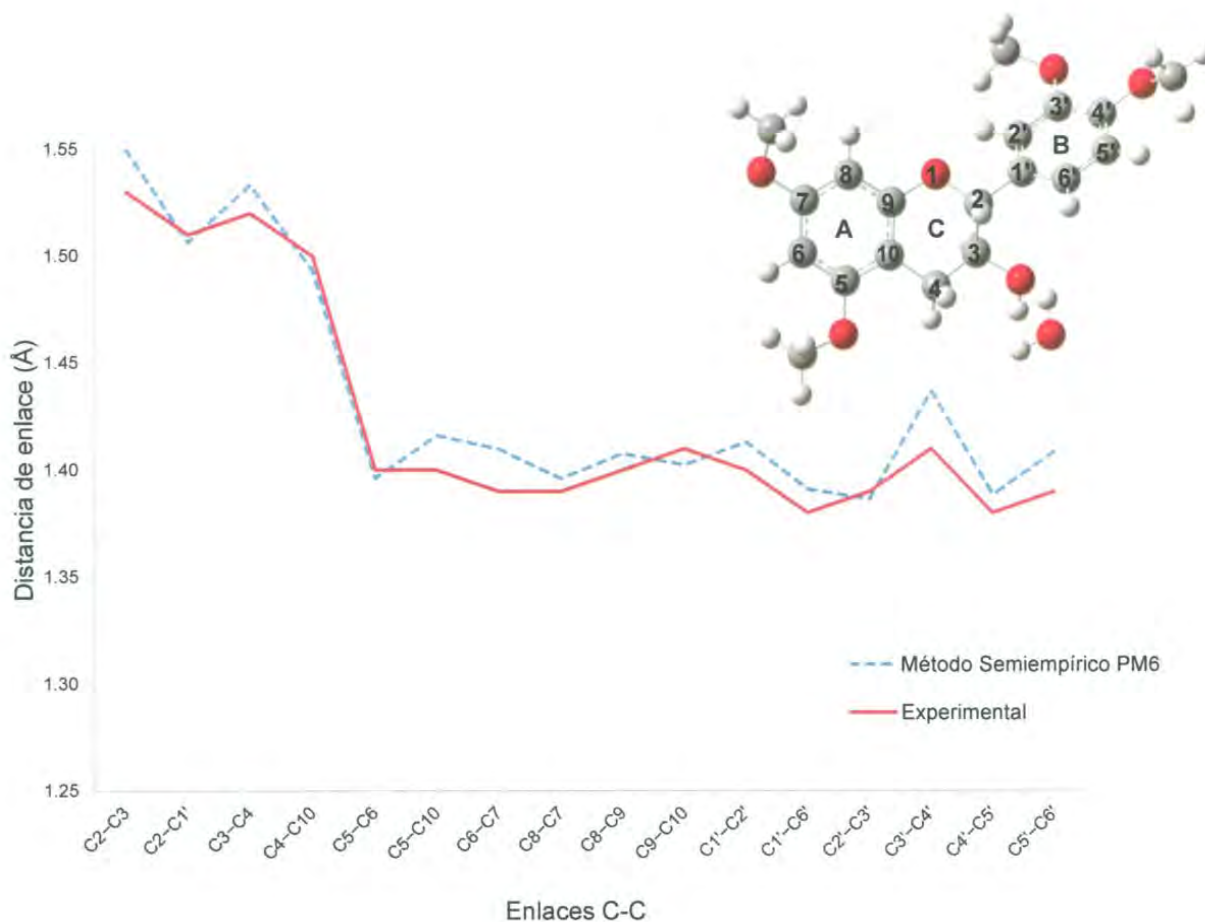
Los estudios de química computacional siempre inician con el diseño o dibujo de las moléculas de interés y el cálculo de su estado de mínima energía denominado optimización de geometría, el cual establece su conformación más estable.

Para asegurar que el método computacional empleado es capaz de reproducir las estructuras de las moléculas en estudio, se hace la comparación de algún parámetro estructural obtenido computacionalmente con datos experimentales reportados en la literatura para alguna molécula de referencia. En este caso se eligió como molécula de referencia a (+)-catequina, la cual representa una de las unidades constitutivas de las PCs. Cabe aclarar que se empleó un derivado conocido como tetra-O-metil-(+)-catequina, debido a que las muestras de (+)-catequina pura carecen de una estructura cristalina adecuada para el estudio de rayos X.

Se compararon las distancias de enlace entre átomos de carbono (C–C), debido a que los enlaces interflaván y los centros quirales C2 y C3 que originan las distintas conformaciones en las PCs, se unen mediante este tipo de enlaces. Se utilizaron los datos experimentales de difracción de rayos-X establecidos por Fronczek *et al.* (1993).

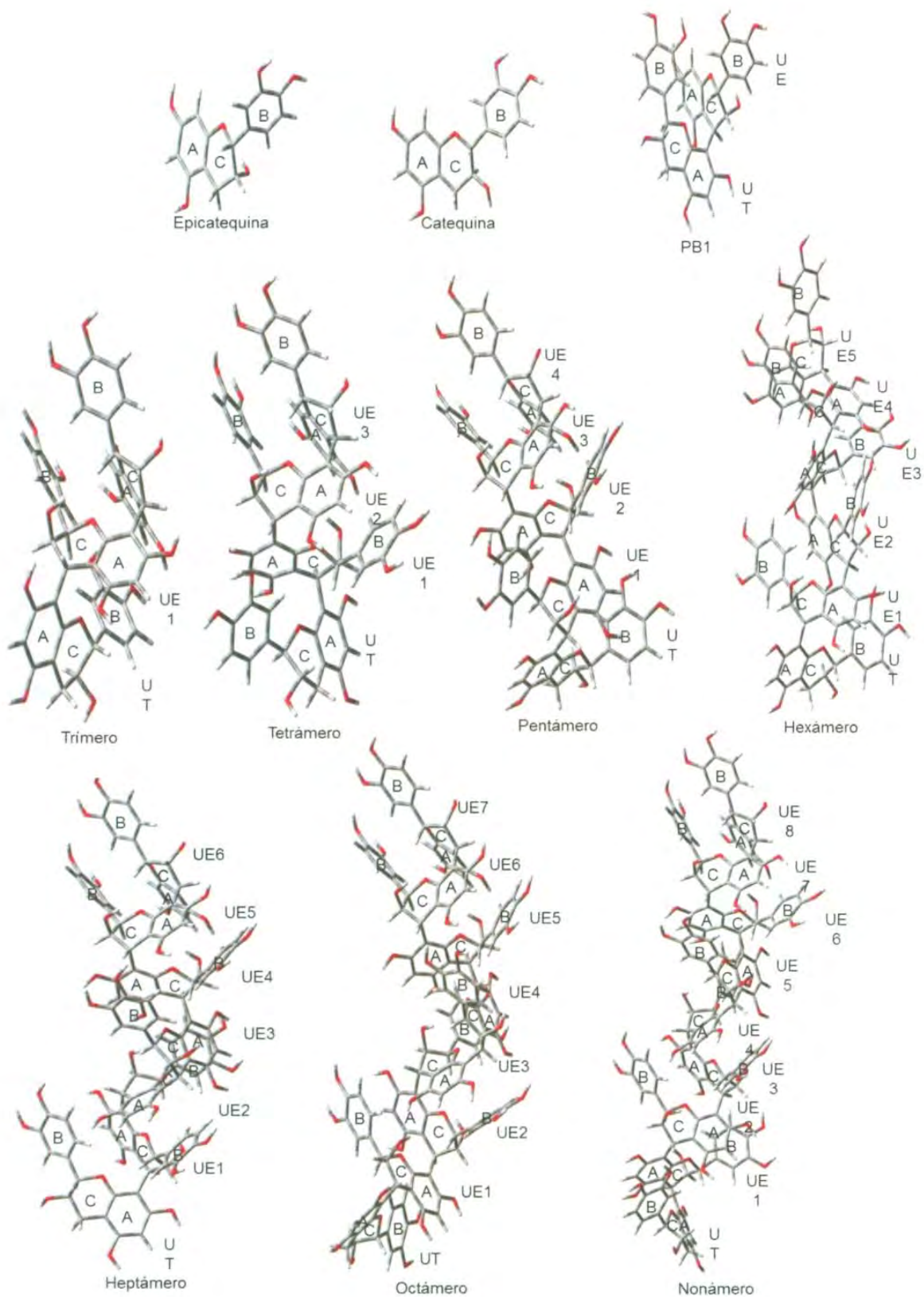
En la Figura 13, se aprecia claramente que el método semiempírico PM6 simula de manera precisa los enlaces C–C de tetra-O-metil-(+)-catequina, por lo que se considera apropiado para el cálculo de propiedades de estructura y reactividad de las PCs.

En la Figura 14, se muestran las estructuras de los monómeros y oligómeros de PCs que se eligieron como representativos del salvado de sorgo con base en el estudio de floroglucinólisis, los cuales fueron optimizados con el método semiempírico PM6. De todas las conformaciones posibles en los oligómeros únicamente se simularon las siguientes: C para el dímero; C-C y C-E para el trímero; C-C-C y C-C-E para el tetrámero; C-C-C-C y C-C-C-E para el pentámero; C-C-C-C-C y C-C-C-C-E para el hexámero; C-C-C-C-C-C y C-C-C-C-C-E para el heptámero, C-C-C-C-C-C-C y C-C-C-C-C-C-E para el octámero,



**Figura 13.** Comparación de distancias de enlace entre átomos de carbono (C–C) en la molécula de tetra-O-metil-(+)-catequina optimizada con el método semiempírico PM6 y datos experimentales de difracción de rayos X.

C-C-C-C-C-C-C-C y C-C-C-C-C-C-C-E para el nonámero. Esto con fundamento en un estudio computacional donde se mostró que la conformación compacta en los dímeros PB1 y PB2 y el trímero PC1 fue la que mostró la mayor estabilidad y capacidad para transferir átomos de hidrógeno y electrones (Mendoza *et al.*, 2014). Adicionalmente se observó que algunos confórmeros con grado de polimerización  $\geq 4$ , los cuales conjugan la conformación C-E al final de la cadena del oligómero también tienden a ser muy estables.



**Figura 14.** Moléculas de procianidinas en su conformación compacta, optimizadas por el método semiempírico PM6.

En la Tabla 5, se muestran los ángulos diedros del enlace interflaván de los oligómeros estudiados, esto con la finalidad de corroborar sus conformaciones. El ángulo diedro del enlace interfaván seleccionado fue: C2–C3–C8–C9, de acuerdo con el cual las conformaciones compactas (*C*) muestran valores positivos y las conformaciones extendidas (*E*) valores negativos.

### 5.8.2 Propiedades de Reactividad Antirradical

En la Tabla 6, se observa que el potencial de ionización (IP) tendió a ser más bajo en el monómero (+)-catequina (8.19 eV) que en (–)-epicatequina (8.34 eV). En términos generales los oligómeros de PCs mostraron menores IP que los monómeros (7.48 – 8.31 eV), lo que indica que requieren menor energía para donar sus electrones y por lo tanto pueden tener mayor capacidad antirradical. En este parámetro de reactividad se encontró mayor dependencia de la conformación que el grado de polimerización de las PCs.

En cuanto a la facilidad para transferir átomos de hidrógeno medida como entalpía de disociación de enlace (BDE), (–)-epicatequina tuvo el valor más alto (68.25 kcal/mol), mientras que (+)-catequina mostró valores comparables con oligómeros desde dímeros a heptámeros (66 - 67.50 kcal/mol). Las menores BDE se encontraron en heptámeros, octámeros y nonámeros con valores entre 63.42 - 66.66 kcal/mol, lo que sugiere mayor capacidad antirradical para estos oligómeros, ya que a menor BDE mayor facilidad para donar átomos de hidrógeno y viceversa.

Las diferencias por efecto del grado de polimerización y conformación empezaron a ser perceptibles a partir de heptámeros.

**Tabla 5.-** Ángulos diedros de las moléculas de procianidina optimizadas con el método semiempírico PM6.

| Molécula/Conformación    | Ángulo Diedro |         |        |         |         |         |         |        |
|--------------------------|---------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
|                          | UE8-UE7       | UE7-UE6 | UE6-UE | UE5-UE4 | UE4-UE3 | UE3-UE2 | UE2-UE1 | UE1-UT |
| Dímero C-C               |               |         |        |         |         |         |         | 96     |
| Trímero C-C              |               |         |        |         |         |         | 76      | 95     |
| Trímero C-E              |               |         |        |         |         |         | 78      | -88    |
| Tetrámero C-C-C          |               |         |        |         |         | 90      | 133     | 103    |
| Tetrámero C-C-E          |               |         |        |         |         | 88      | 139     | -91    |
| Pentámero C-C-C-C        |               |         |        | 90      |         | 137     | 115     | 167    |
| Pentámero C-C-C-E        |               |         |        | 86      |         | 137     | 100     | -89    |
| Hexámero C-C-C-C-C       |               |         | 89     | 133     |         | 97      | 119     | 109    |
| Hexámero C-C-C-C-E       |               |         | 90     | 132     |         | 108     | 113     | -103   |
| Heptámero C-C-C-C-C-C    |               |         | 137    | 103     |         | 124     | 109     | 117    |
| Heptámero C-C-C-C-C-E    |               |         | 174    | 94      |         | 85      | 140     | -96    |
| Octámero C-C-C-C-C-C-C   |               | 86      | 134    | 91      | 131     | 109     | 118     | 95     |
| Octámero C-C-C-C-C-C-E   |               | 86      | 134    | 91      | 130     | 110     | 119     | -91    |
| Nonámero C-C-C-C-C-C-C-C | 91            | 136     | 104    | 126     | 116     | 121     | 124     | 117    |
| Nonámero C-C-C-C-C-C-C-E | 89            | 133     | 106    | 121     | 109     | 118     | 101     | -90    |



Las unidades de extensión (UE) resultaron tan reactivas como las unidades terminales (UT) desde dímero a hexámero, pero a partir de heptámero solo las unidades de extensión mostraron la mayor facilidad para donar átomos de hidrógeno.

Cuando las PCs donan sus electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres forman como intermediarios radicales cationes y radicales fenoxilo, cuya estabilidad también puede ser determinante en su actividad antirradical.

En la Tabla 6, se puede visualizar que los radicales cationes y los radicales fenoxilo no mostraron una tendencia bien definida en los cambios de energía por efecto del grado de polimerización y/o la conformación, por lo que no es fácil establecer una relación de estabilidad energética con las diferencias en actividad antirradical en las PCs de sorgo simuladas.

**Tabla 6.** Propiedades de reactividad y estabilidad de PCs de salvado de sorgo

| Molécula/Conformación | Propiedades                       |   |   |                                |
|-----------------------|-----------------------------------|---|---|--------------------------------|
|                       | Reactividad                       |   | Estabilidad                                   |                                |
|                       | IP (eV)<br>donador e <sup>-</sup> | BDE <sub>min</sub><br>(kcal/mol)<br>donador H | ΔE RC<br>(kcal/mol)<br>donador e <sup>-</sup> | ΔER<br>(kcal/mol)<br>donador H |
| (-)-Epicatequina      | 8.34                              | 68.25   | 192.26  | 20.98                          |
| (+)-Catequina         | 8.19                              | 67.50   | 188.79  | 20.20                          |
| Procianidina B1       |                                   |   |   |                                |
| C                     | 8.11                              | 67.26 UT                                      | 187.03  | 20.05                          |
| Trímero               |                                   |   |   |                                |
| C-C                   | 8.31                              | 67.43 UT                                      | 191.52  | 20.36                          |
| C-E                   | 8.30                              | 67.37 UE2                                     | 191.44  | 20.42                          |
| Tetrámero             |                                   |   |   |                                |
| C-C-C                 | 7.68                              | 67.35 UE3                                     | 177.01  | 20.49                          |
| C-C-E                 | 8.25                              | 66.00 UT                                      | 190.16  | 18.68                          |
| Pentámero             |                                   |   |   |                                |
| C-C-C-C               | 7.75                              | 67.35 UE4                                     | 178.62  | 20.67                          |
| C-C-C-E               | 7.85                              | 67.63 UT                                      | 181.09  | 20.35                          |
| Hexámero              |                                   |   |   |                                |
| C-C-C-C-C             | 7.86                              | 67.29 UE5                                     | 181.36  | 20.77                          |
| C-C-C-C-E             | 7.85                              | 66.45 UT                                      | 181.06  | 19.94                          |
| Heptámero             |                                   |   |   |                                |
| C-C-C-C-C-C           | 7.69                              | 63.42 UE3                                     | 177.30  | 16.95                          |
| C-C-C-C-C-E           | 7.88                              | 64.14 UE6                                     | 181.62  | 17.82                          |
| Octámero              |                                   |   |   |                                |
| C-C-C-C-C-C-C         | 7.94                              | 65.03 UE2                                     | 183.10  | 18.66                          |
| C-C-C-C-C-C-E         | 7.48                              | 65.64 UE4                                     | 172.40  | 19.34                          |
| Nonámero              |                                   |   |   |                                |
| C-C-C-C-C-C-C-C       | 7.79                              | 66.66 UE8                                     | 179.72  | 20.57                          |
| C-C-C-C-C-C-C-E       | 7.56                              | 63.57 UE5                                     | 174.41  | 17.36                          |

IP = potencial de ionización; BDE = entalpía de disociación de enlace; ΔE RC = energía del radical catión – energía de la molécula neutra; ΔE R = energía del radical – energía de la molécula neutra.

## VI. CONCLUSIONES

Las PCs identificadas en el salvado de sorgo fueron oligómeros de PCs con grado de polimerización  $\geq 8$ , con unidades de extensión constituidas por (-)-epicatequina y (+)-catequina como unidades terminales, enlazadas principalmente por uniones interflaván del tipo C4→C8.

Los oligómeros con grado de polimerización  $\geq 8$  se encontraron en una concentración de 11.06 mg/g, Procianidina B1 de 0.0541 mg/g, (+)-catequina de 0.02764 mg/g, (-)-epicatequina de 0.0260 mg/g y las PCs no identificadas representaron una cantidad de 0.3373 mg/g.

La fracción de PCs mostró altos porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica y elevadas tasas constantes de segundo orden al reaccionar con el radical DPPH\*, sin embargo estas no fueron superiores a las que alcanzó el extracto fenólico completo.

La capacidad de inhibición del radical ABTS\*<sup>-</sup> fue mayor para la fracción de PCs que el extracto fenólico.

El estudio computacional indica que los oligómeros de PCs mostraron menores potenciales de ionización( IP) que los monómeros, mientras que los heptámeros, octámeros y nonámeros presentaron las menores entalpías de disociación de enlace (BDE), lo que en conjunto representa una mayor capacidad antirradical.

Las diferencias en capacidad antirradical por efecto del grado de polimerización y conformación empezaron a ser perceptibles a partir de heptámeros.

## VII. RECOMENDACIONES

Es recomendable realizar un estudio de HPLC empleando un detector de masas para identificar las procianidinas no identificadas.

Sería conveniente efectuar un estudio de HPLC en fase normal para intentar separar el pico ancho detectado a los 44 min del gradiente empleado.

Realizar un estudio más detallado del extracto fenólico completo del salvado de sorgo de la variedad café empleada, ya que mostró un potencial de inhibición de radicales libres muy importante.

Realizar estudios computacionales de los oligómeros de procianidinas que mostraron la mayor capacidad antirradical a niveles de teoría más elevados para incrementar la precisión de los datos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. (2000). Method 44-15.02 (humedad). 10<sup>th</sup> ed. St. Paul, MN. American Association of Cereal Chemists.
- Ambula, M.K., Oguho, G.W., Tuitoek, J.K. (2001). Effects of sorghum tannins, a tannin binder (polyvinylpyrrolidone) and sorghum inclusion level on the performance of broiler chicks. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 14, 1276–1281.
- Amić D. y Lučić, B. (2010). Reliability of bond dissociation enthalpy calculated by the PM6 method and experimental TEAC values in antiradical QSAR of flavonoids *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 28–35.
- Amorim H.V., Teixeira A.A., Moraes R.S., Reis A.J., Pimentel-Gomes F. y Malavolta E. (1973). Studies on the mineral nutrition of coffee. XXVII. Effect of N, P and K fertilization on the macro and micronutrients of coffee fruits and on beverage quality, *Ann. Esc. Sup. Agric. LQ (Piracicaba)*.
- Andersen M. y Markham K. R. (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Arteel G. E. y Sies H. (1999). Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Letters* 462 (1): 167-170.
- Awika J. M. y Rooney L. W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65, 1199-1221.

- Awika J. M., McDonough C. M. y. Rooney L. W. (2005). Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6230-6234.
- Awika J. M., Rooney L. W., Wu X., Prior R. L., y Cisneros-Zevallos L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6657-6662.
- Bertran J., Branchadell V., Moreno M. y Sodupe M. (2000). *Química Cuántica*, Editorial Síntesis, Madrid. (1ra Ed). pp 1-287.
- Bors W., Foo Y. L., Hertkorn N., Michel C. y Stettmaier K. (2001), Chemical studies of proanthocyanidins and hydrolysable tannins. *Antioxid. Redox. Sign* 3: 995-1008.
- Bushra S., Farooq A., Muhammad R. A. y Ali S. C. (2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: stabilization of corn oil. *Grasas y aceites* 59 (3): 205-217.
- Castro A, S.I. (2013). Caracterización espectroscópica y computacional de prociandinas de manzana y sus productos de oxidación en la reacción con radicales libres. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México.
- Chan D. C., Kim P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* 3: 681-684.
- Cheyrier V., Rigaud J. y da Silva J. M. R. (1992). Structure of procyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties. *Plant Polyphenols*, Springer, 281-294.

- Chiu, K. L., Cheng, Y.-C., Chen, J. H., Chang, C.J., Yang, P. W., 2002. Super critical fluids extraction of ginkgo ginkgolides and flavonoids. *Journal of Supercritical Fluids* 24, 77–8.
- Deshpande S.S., Cheryan M., Salunkhe D.K. (1986). Tannin analysis of food products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24: 401-449.
- Dicko M. H., Gruppen H., Traoré A. S., Van Berkel W. J. H. y Voragen, A. G. J. (2005). Evaluation of the effects of germination, the content of phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2581-2588.
- Duodu K. G. y Belton P. S. (2007) Chemical composition and antioxidant effects of extracts from sorghum flour and bran. Department of Food Science, University of Pretoria, South Africa.
- Dykes L, Rooney LD, Waniska RD, Rooney WL (2005). Phenolic compounds and antioxidant activity of sorghum grains of varying genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6813-6818.
- Esatbeyoglu T., Jaschok-Kentner B., Wray V. y Winterhalter P. (2011). Structure elucidation of procyanidin oligomers by low-temperature <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(1): 62-69.
- Espín J. C., Soler-Rivas C., Wichers H. J. y García-Viguera C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: a new source antiradical activity for foodstuff. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 1588-1592.

- FAO, Food and Agricultural Organization of the United Nations. (2014). Estadísticas. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Consultado: Octubre, 2014.
- Foo L. Y. (1981). Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry* 20(6): 1397-1402.
- Foo L. Y. y Karchesy J. J. (1989). Procyanidin polymers of Douglas fir bark: structure from degradation with phloroglucinol. *Phytochemistry* 28(11): 3185-3190.
- Foresman J. B. y Frisch A. E. (1996). Exploring chemistry with electronic structure methods. Gaussian, Inc.: Second edition. U.S.A. 3-301.
- Foti M. C., Daquino C., Mackie I. D., DiLabio G. A. y Ingold K. U. (2008). Reaction of phenols with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Kinetics and DFT calculations applied to determine ArO-H bond dissociation enthalpies and reaction mechanism. *The Journal of organic chemistry* 73 (23): 9270-9282.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 8: 1925–1941.
- Frederiksen R. A. (1986). Compendium of sorghum diseases. American Phytopathological Society., St Paul, Minnesota 55121.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M.A., Cheeseman, J. R. (2004). Gaussian 03, Revision C.02. Wallingford, CT: Gaussian, Inc.



- Fronczeck F. R., Heminway R. W., McGraw G. W., Steynberg J. P., Helfer C. A. y Mattice W. L. (1993). Crystal structure, conformational analysis, and molecular dynamics of tetra-o-methyl-(+)-catechin. *Biopolymers*. 33:275-282.
- Geissman T. y Yoshimura N. (1966). Synthetic proanthocyanidin. *Tetrahedron Letters* 7(24): 2669-2673.
- Gomez-Cordoves C., Bartolome B., Vieira W., Virador V. M. (2001). Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 49:1620-1624.
- González-Torres M. C., Betancourt-Rule M. y Ortiz-Muñiz R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica* 25 (1): 3-9.
- Gülçin, I, Güngör, S.I., Sükrü, B., Mahfuz, E. Ö., Küfrevioğlu, I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry* 87: 393–400.
- Gu L., Kelm M., Hammerstone J. F., Beecher G., Cunningham D., Vannozzi S. y Ronald L. (2002). Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (17): 4852-4860.
- Gu L., Kelm M., Hammerstone J. F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D. y Prior R. L. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7513-7521.

- Gupta, R.K. y Haslam, E. (1978). Plant Proanthocyanidins. Part 5.I Sorghum Polyphenols. J.C.S. Perkin I, Pp 892-896.
- Guyot S., Marnet N. y Drilleau J. F. (2001). Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(1): 14-20.
- Hahn D.H., Rooney L.W., Faubion J.M. (1983). Sorghum phenolic acids, their high performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance. Cereal Chem. 60: 255-259.
- Halliwel. B. Antioxidants and human disease: A general introduction (1997). Nutr. Rev. 55:S44-S52.
- Hamauzu Y., Inno T., Kume C., Irie M. y Hiramatsu K. (2006). Antioxidant and antiulcerative properties of phenolics from Chinese quince, quince, and apple fruits. J Agric Food Chem. 54(3):765-72.
- Hemingway R. W. (1989). Reactions at the interflavanoid bond of proanthocyanidins. Chemistry and Significance of Condensed Tannins Springer: 265-283.
- Hotta H., Sakamoto H., Nagano S., Osakai T. y Tsujino Y. (2001). Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. Biochim Biophys. Acta. 1526: 167-169.
- James K. N., Bruce A. B., Muraleedharan G. N., Daniel A. H. y William J. M. (2001) Rapid quantification of proanthocyanidins (condensed tannins) with a continuous flow analyzer J. Agric. Food Chem 49: 2207-2214.

- Jensen F. (1999). Introduction to computational chemistry. New York, John Wiley and Sons. 1-583.
- Jurd L. (1967). Anthocyanidins and related compounds—XI: Catechin-flavylium salt condensation reactions. *Tetrahedron* 23(3): 1057-1064.
- Justino L. (1997). Determination of changes in sugar composition during the aging of honey by HPLC, FTIR and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 34(4): 435-486.
- Kakiuchi T., Mukai K., Ohara K., Nagaoka S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 82 (2009) 216.
- Karonen, M., Loponen, J., Ossipov, V. y Pihlaja, K. (2004). Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase highperformance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 522, 105-112.
- Keitaro H. y Ken-ichiro K. (1988). Stopped-flow time difference analysis a review. *Analytical Sciences* 4: 445-454.
- Kennedy J. A. y Jones G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of agricultural and food chemistry* 49(4): 1740-1746.
- Khan M L., Haslam E. y Williamson M. P. (1997). Structure and conformation of the procyanidin B-2 dimer. *Magnetic Resonance in Chemistry* 35: 854-858.

- Krueger CG, Vestling MA, Reed JD (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Agric. Food Chem.* 51:538–543.
- Kühnau J. (1976). The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191.
- Labarbe B., Cheynier V. y Brossaud F. (1999). Quantitative ractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal Agricultural Food Chemistry.* 47: 2719-2723.
- Lambert J. B., Shurvell H. F., Lightner D.A. y Cooks G. R. (1998). *Organic structural spectroscopy.* Prentice-Hall, Inc.
- Leopoldini M., Marino, T., Russo. N. y Toscano M. 2004. antioxidant properties of phenolic compouds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J. Phys. Chem. A.* 108, 4916-4922.
- LeRoux E., Doco T., Sarni-Manchado P., Lozano Y. y Cheynier V. (1998). A-type proanthocyanidins from pericarp of *Litchi chinensis*. *Phytochemistry* 48(7): 1251–1258.
- Lu L., Liu S., Jiang S., Wu S. (2004). Tannins inhibits HIV-1 entry by targeting gp41. *Acta Pharma* 25: 213-218.
- Maiga, A., Malterud, K. E., Mathisen, G. H., Paulsen, R. E., Thomas-Oates, J., Bergstrom, E., Reubsaet, L., Diallo, D. y Paulsen, B. S. (2007). Cell protective antioxidants from the root bark of *Lannea velutina* A. Rich., a Malian medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1, 66-79.

- Marković Z., Milenković D., Dorović J., Dimitrić J. M., Stepanić V., Lučić B. y Amić D. (2012). PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. *Food Chemistry* 134(4): 1754-1760.
- Marston, A., 2007. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2785–2797.
- Mendoza-Wilson A. M., Armenta-Vázquez M., Castro-Arredondo S., Espinosa-Plascencia A., Robles-Burgueño M., González-Ríos H., González-León A., Balandrán-Quintana R. (2013). Potential of polyphenols from an aqueous extract of apple peel as inhibitors of free radicals: An experimental and computational study. *Journal of Molecular Structure*, 1035: 61–68.
- Mendoza-Wilson A. M., Castro-Arredondo S. I. & Balandrán-Quintana, R. R. (2014). Computational study of the structure-free radical scavenging relationship of procyanidins. *Food Chemistry* 161: 155-161.
- Meo, F.D., E. Anouar, P. Podloucka, G. Fabre, P.Trouillas. 2013. Understanding antioxidant properties of natural compounds at the atomic Scale. *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics* 7: 58-70.
- Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K. (2008). Solid-Phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*.1187 18-24.
- Mohamed, M.E. (2013). Structure-Antioxidant Activity Relationship Study of Eugenol Derivatives Using semi-empirical Method. *New York Science Journal* 6(1): 102-106.

- Okuda T., Yoshida T., Hatano T. (1991). Chemistry and biological activity of tannins in medicinal plants. *Economic and medicinal plant research*, Vol 5, Wagner, H, Farnsworth, N. R. Eds, Academic Press: London, 129-165.
- Passos C. P., Cardoso S. M., Barros A. S., Silva C. M. y Coimbra M. A. (2010). Application of Fourier transform infrared spectroscopy and orthogonal projections to latent structures/partial least squares regression for estimation of procyanidins average degree of polymerisation. *Analytica Chimica Acta* 661(2): 143-149.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M. y Brighenti F. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* 133: 2812–2819.
- Pérez-Trueba G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22(1): 0-0.
- Pietta P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.
- Plumb G. W., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Cheynier V. y Williamson G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research* 29(4): 351-358.
- Ramirez-Coronel M. A., Marnet N., Kolli V. S. K., Roussos S., Guyot S. y Augur C. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid

chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(5): 1344-1349.

Rooney L. W. (1971). Utilization of sorghum grain: food and industrial. Grain sorghum research in Texas 1970. Texas Agric.Expt. Stn. Rept. 71-81.

Schmidt C. A. (2011). Phytochemical and biological studies of *Parapiptadenia rigida*. Tesis Doctoral, Freiburg (Breisgau), Univ., Diss.

Sendra J. M., Sentandre E. Y Navarro J. L. (2007). Kinetic model for the antiradical activity of the isolated p-catechol group in flavanone type structures using the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as the antiradical probe. *J. Agric. Food Chem.* 55 (14): 5512-5522.

Siebert F. y Hildebrandt P. (2008). *Vibrational spectroscopy in life science*. Wiley-VCH Verlag Hmbh & Co. KGaA. First Edition. U.S.A 330.

Sikwese F.E., Duodu K.G. (2007). Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. *Food Chemistry* 104: 324–331.

Stewart, J. J. P. 2007. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model* 13: 1173–1213.

Suganya P., Saravanakumar M. y Mohandas S. (2011). Identification of 3-deoxyanthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran and its biological properties. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 5(7): 181-193.

- Sullivan, D. and D. Carpenter (1993). Methods of analysis for nutrition labeling. AOAC International. Arlington, 85-104.
- Tarascou, I., Ducasse, M. A., Dufourc, E. J., Moskau, D., Fouquet, E., Laguerre, M., y Pianet, I. (2007). Structural and conformational analysis of two native procyanidin trimers. *Magnetic Resonance in Chemistry* 45: 157-166.
- Thompson R. S., Jacques D., Haslam E. y Tanner R. J. N. (1972). Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 1387-1399.
- Touriño S., Selga A., Jiménez A., Juliá L., Lozano C., Lizárraga D., Cascante M. y Torres J. L. (2005). Procyanidin fraction from pine (*pinus pinaster*) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion and antiproliferative effect in melanoma cells. *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 4728-4735.
- Tsimogiannis D. I. y Oreopoulou V. (2006). The contribution of flavonoid c-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3V,4V-Hydroxy substituted members. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 7: 140-146.
- Van Acker, S. A .B. E., Van Den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F. y Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Rez, and Med.* 20: 331-342.



- Velasco, J., Dobarganes, M.C., Márquez-Ruiz, G. (2002). Oxidación en sistemas lipídicos heterofásicos: emulsiones aceite en agua. *Grasas y Aceites*. 239 (53): 239-247.
- Vennat B., Bos M.-A., Pourrat A. y Bastide P. (1994). Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 17(12):1613-1615.
- Vieira O. V., Laranjinha J. A., Madeira V. M. y Almeida L. M. (1996). Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *Journal of Lipid Research* 37(12): 2715-2721.
- Wright, J. S., Johnson, E. R. y Di Labio, G. A. 2001. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1173-1183
- Wu L., Huang Z., Qin P., Yao Y., Meng X., Zou J., Zhu K., y Ren G. (2011). Chemical characterization of a procyanidin-rich extract from sorghum bran and its effect on oxidative stress and tumor inhibition in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (16): 8609-8615.
- Xu B. y Chang, S. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* 72: 159-166.
- Xu L. Rui Liu , Duandan Li, Shi Tu, Jing Chen . (2011). An in vitro study on the dental caries preventing effect of oligomeric procyanidinsin sorghum episperm. *Food Chemistry* 126: 911–916

Xu Z. (2012). Analysis methods of phenolic acids. analysis of antioxidant rich phytochemicals 3: 69-104.

Young D. (2001). Computational chemistry a practical guide for applying techniques for the real world problems. Wiley Interscience. (1rst edition). New York, U.S.A. 1-408.