



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Relaciones Cuantitativas de Estructura-Actividad de Antocianinas Bioactivas, Análisis Conformacional de Antocianidinas y Estudio Estructural de Antocianinas Aciladas Naturales

Tesista: Lic. Nicolas Alejandro Szewczuk

Directora: Prof. Dra. Alicia Beatriz Pomilio

Director: Prof. Dr. Pablo Román Duchowicz

Año: 2025

Resumen de esta Tesis de Doctorado

La presente Tesis de Doctorado constituye una contribución significativa al entendimiento de las antocianinas, compuestos fenólicos de gran relevancia biológica e industrial, abordando sus características estructurales, propiedades fisicoquímicas, estabilidad, bioactividad y aplicaciones potenciales (introducción a la temática, Capítulos 1, 2 y 3).

La investigación avanzó hacia la elucidación estructural y evaluación experimental de antocianinas aciladas presentes en flores del género *Ipomoea cairica*, abordando los desafíos asociados a su extracción, purificación, análisis e identificación inequívoca. Estos estudios abordados en el Capítulo 4 demostraron que las modificaciones estructurales, como la acilación, no sólo mejoran la estabilidad química de las antocianinas, sino que también potencian sus propiedades funcionales, como la resistencia a condiciones ambientales adversas y su capacidad antioxidante.

Por otro lado, a través de un enfoque integral, en el Capítulo 5 se exploraron tanto aspectos fundamentales como aplicados de estos metabolitos secundarios, comenzando con una caracterización teórica detallada de las antocianidinas más representativas en la naturaleza. Este estudio permitió identificar las relaciones entre la estructura molecular y la estabilidad conformacional, destacando la coexistencia de estructuras quinoidales cargadas positivamente con sales de flavilio en equilibrio dentro del espacio conformacional. Mediante herramientas computacionales avanzadas, como DFT y teorías NBO y AIM, se revelaron en el Capítulo 6 los mecanismos electrónicos y topológicos que modulan la reactividad química de estos compuestos, estableciendo vínculos entre sus características estructurales y su capacidad antioxidante y antimutagénica. Estos hallazgos proporcionaron una base sólida para interpretar y predecir sus comportamientos biológicos y funcionales en diversos entornos.

La integración de modelos QSAR permitió predecir con precisión las actividades antioxidante, antimutagénica y anticarcinogénica de estos compuestos, subrayando el valor de herramientas computacionales para optimizar su aprovechamiento en la industria farmacéutica y nutracéutica (Capítulo 7).

Finalmente, los ensayos *in vitro*, *in vivo* y clínicos descritos en el Capítulo 8 validaron los resultados teóricos y computacionales, estableciendo una conexión lógica y coherente entre los fundamentos moleculares y su aplicación biológica.

Este enfoque multidisciplinario no sólo amplía el conocimiento sobre las antocianinas, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a su estabilización, biodisponibilidad y potencial terapéutico, posicionándolas como agentes clave en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas.

Objetivo general

Llevar a cabo un estudio integral de antocianidinas y antocianinas con potencial actividad biológica, mediante su aislamiento, caracterización estructural, análisis teórico-computacional y evaluación biofarmacológica, con el fin de comprender su comportamiento molecular y su relación con propiedades bioactivas de interés terapéutico.

Objetivos específicos

Aislar y caracterizar estructuralmente antocianinas aciladas complejas a partir de fuentes naturales, empleando técnicas químicas y espectroscópicas que permitan su identificación precisa, considerando las limitaciones asociadas a su estabilidad y sensibilidad ambiental.

Realizar estudios teóricos computacionales de antocianidinas seleccionadas, enfocados en el análisis conformacional, electrónico y topológico, con el fin de establecer relaciones entre sus propiedades estructurales y su actividad biológica, especialmente su potencial antioxidante.

Desarrollar y validar modelos QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) que permitan predecir y racionalizar la actividad antioxidante, antimutagénica y anticancerígena de antocianinas y flavonoides estructuralmente relacionados, utilizando descriptores moleculares relevantes dentro de marcos estadísticos y químicos confiables.

Evaluar ensayos clínicos en humanos relacionados con la administración de antocianinas y sus efectos biológicos, integrando la evidencia teórica y experimental con resultados *in vivo*, *in vitro* y ensayos clínicos, para contribuir al entendimiento de su biodisponibilidad, eficacia terapéutica y aplicaciones potenciales en salud humana.

Índice

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. ¿Qué son las antocianinas?	2
1.2. Estructuras químicas de las antocianinas.....	3
1.3. Biosíntesis o anabolismo de las antocianinas	6
1.3.1. <i>Estudios bioinformáticos</i>	10
1.4. Acerca de este trabajo de Tesis	11
Capítulo 2. Biodisponibilidad y estabilidad de las antocianinas	13
2.1. Biodisponibilidad y actividad biológica de las antocianinas	14
2.1.1. <i>Estudios bioinformáticos</i>	14
2.1.2. <i>Propiedades biológicas de las antocianinas</i>	15
2.2. Estabilidad de las antocianinas	16
2.3. Factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas.....	17
2.3.1. <i>Efectos de la concentración de antocianinas y solventes</i>	17
2.3.2. <i>Influencia del pH</i>	18
2.3.3. <i>Temperatura</i>	20
2.3.4. <i>Oxígeno</i>	21
2.3.5. <i>Luz</i>	21
2.3.6. <i>Ácido ascórbico</i>	22
2.3.7. <i>Sulfitos</i>	23
2.3.8. <i>Enzimas</i>	24
2.3.9. <i>Efecto de la co-pigmentación</i>	25
2.3.9.1. <i>Co-pigmentación por Auto-asociación</i>	28
2.3.9.2. <i>Co-pigmentación intra- e intermolecular</i>	28
2.3.9.3. <i>Co-pigmentación por interacciones con iones metálicos</i>	30
2.3.10. <i>Piranoantocianinas</i>	30
2.4. Conclusiones del Capítulo 2.....	31
Capítulo 3. Antocianinas y su relación con la actividad antioxidante.....	33
3.1. Actividad antioxidante	34
3.2. Ensayos de medición de actividad antioxidante	35
3.3. Actividad antioxidante de las antocianinas.....	36
3.4. Reacciones de antocianidinas y antocianinas con especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno	42

3.5. Propiedades electroquímicas de las antocianinas y antocianidinas	44
3.6. Efecto de las interacciones sobre la actividad antioxidante de las antocianinas.....	45
3.7. Efectos antioxidantes de las antocianinas en células, animales de experimentación y en humanos.....	46
3.8. Acción directa e indirecta de las antocianinas	47
3.9. Conclusiones del Capítulo 3.....	49
Capítulo 4. Estudio estructural de Antocianinas Aciladas aisladas de <i>Ipomoea cairica</i>	51
4.1. Introducción al estudio de antocianinas aciladas de <i>Ipomoea cairica</i>	52
4.2. Género <i>Ipomoea</i>	53
4.3. Elucidación de las estructuras de las antocianinas aciladas de <i>Ipomoea cairica</i> realizada en esta Tesis	55
4.3.1. <i>Antocianinas aciladas presentes en Ipomoea cairica</i>	55
4.3.2. <i>Identificación de las antocianinas aciladas obtenidas de flores de Ipomoea cairica</i>	57
4.3.3. <i>Datos espectroscópicos en común para las estructuras químicas de las antocianinas aciladas 1-7</i>	58
4.3.3.1. <i>Antocianina acilada 1</i>	59
4.3.3.2. <i>Antocianina acilada 2</i>	63
4.3.3.3. <i>Antocianina acilada 4</i>	64
4.3.3.4. <i>Antocianinas aciladas 3 y 5</i>	64
4.3.3.5. <i>Antocianinas aciladas 6 y 7</i>	67
4.4. Estabilidad de las antocianinas aciladas obtenidas en esta Tesis	70
4.4.1. <i>Cinética de la degradación de las antocianinas 1-9</i>	71
4.4.2. <i>Actividad antioxidante de las antocianinas 1-9: Ensayo de la actividad de captación de radicales DPPH'</i>	72
4.5. Conclusiones del Capítulo 4.....	73
Capítulo 5. Estudio y caracterización del espacio conformacional de antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas	75
5.1. Introducción a la exploración del espacio conformacional de las antocianidinas.....	76
5.2. ¿Por qué proponer una nomenclatura común?	76
5.2.1. <i>Nomenclatura propuesta</i>	77
5.3. Metodología	83

5.4. Curvas de energía potencial	84
5.5. Análisis del espacio conformacional	92
5.5.1. Poblaciones relativas y aspectos estructurales generales en vacío	95
5.5.2. Espacio conformacional en solventes	101
5.6. Conclusiones del Capítulo 5.....	106
Capítulo 6. Análisis topológico y electrónico del espacio conformacional de antocianidinas y su relación con bioactividades	107
6.1. Introducción a la caracterización del espacio conformacional de las antocianidinas.....	108
6.2. Metodología	108
6.3. Propiedades moleculares en el espacio conformacional	112
6.3.1. Momento dipolar aparente.....	112
6.3.2. Polarizabilidad molecular	114
6.4. Estructuras quinoidales cargadas positivamente.....	116
6.4.1. Distancias de enlace en antocianidinas hidroxiladas.....	119
6.4.2. Distancias de enlace en antocianidinas metoxiladas	121
6.4.3. Otros aspectos geométricos.....	123
6.5. Estudio electrónico y topológico	125
6.5.1. Cargas naturales atómicas (NBO)	126
6.5.2. Estudio del sistema π	130
6.5.3. Estudio de los enlaces C-C	134
6.6. Relación estructura-actividad e importancia del espacio conformacional	138
6.6.1. Orbitales moleculares de frontera	138
6.6.2. Actividad antioxidante: Relación con las propiedades estructurales y electrónicas de antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas.....	143
6.6.2.1. Antocianidinas hidroxiladas: Influencia de la brecha energética y la distribución electrónica	143
6.6.2.2. Antocianidinas metoxiladas: Efectos del grado de sustitución y comportamiento redox.....	144
6.6.3. Análisis de la actividad antimutagénica de las antocianidinas mediante la inhibición de la enzima CYP3A4.....	145
6.7. Conclusiones del Capítulo 6.....	146
Capítulo 7. Estudio de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de las actividades antioxidantes, antimutagénica y anticarcinogénica de antocianinas	149

7.1. Estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR)	150
7.1.1. <i>Relación de Estructura-Actividad (SAR)</i>	150
7.1.2. <i>La teoría QSAR/QSPR</i>	151
7.1.3. <i>Objetivos de un modelo QSAR</i>	152
7.1.4. <i>Aplicación de la teoría QSAR</i>	153
7.1.5. <i>El modelo QSAR</i>	153
7.1.6. <i>Enfoques específicos QSAR</i>	154
7.1.7. <i>Principios del modelado QSAR</i>	155
7.1.8. <i>Descriptores moleculares</i>	155
7.1.9. <i>La estructura molecular</i>	157
7.1.10. <i>Antecedentes y estado del arte</i>	158
7.1.11. <i>Estudios QSAR en antocianinas</i>	160
7.2. Análisis QSAR de la actividad antioxidante y captación de radicales libres de antocianinas	161
7.2.1. <i>Actividad antioxidante y capacidad de captación de radicales libres de antocianinas</i>	164
7.2.2. <i>Desarrollo de los modelos QSAR para la actividad antioxidante</i>	164
7.2.3. <i>Resultados y discusión</i>	166
7.2.4. <i>Conclusiones de los modelos QSAR obtenidos para la actividad antioxidante</i>	173
7.3. Análisis QSAR de la actividad antimutagénica por medio de la modulación del citocromo P ₄₅₀ ³ A ₄	174
7.3.1. <i>Conjunto molecular en estudio y datos de la actividad inhibitoria experimental</i>	175
7.3.2. <i>Desarrollo de los modelos QSAR para la actividad antimutagénica</i>	176
7.3.3. <i>Resultados y discusión</i>	177
7.3.4. <i>Conclusiones de los QSAR obtenido para la actividad antimutagénica</i>	181
7.4. Análisis QSAR de la actividad anticarcinogénica evaluada en la línea celular MCF-7	181
7.4.1. <i>Conjunto molecular en estudio y datos de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) experimental</i>	183
7.4.2. <i>Desarrollo de los modelos QSAR para la actividad anticarcinogénica</i>	183
7.4.3. <i>Resultados y discusión</i>	185

7.4.4. Conclusiones de los modelos QSAR obtenidos para la actividad anticarcinogénica	188
7.5. Conclusiones del Capítulo 7.....	189
Capítulo 8. Antocianinas de fuentes naturales. Evaluación de estudios <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> y ensayos clínicos en humanos.....	191
8.1. Introducción	192
8.2. Efectos de alimentos ricos en antocianidinas, antocianinas y metabolitos en los condrocitos humanos (HC)	193
8.3. Efectos de los alimentos ricos en antocianinas en pacientes con artrosis en ensayos clínicos en humanos.....	200
8.4. Efectos de los alimentos ricos en antocianinas en pacientes con sobrepeso/obesidad en ensayos clínicos en humanos.....	207
8.5. Conclusiones del Capítulo 8.....	214
Capítulo 9. Parte experimental.....	215
9.1. Solventes, reactivos y compuestos químicos.....	216
9.2. Antocianinas aciladas provenientes de <i>Ipomoea cairica</i>	216
9.2.1. Material vegetal.....	216
9.2.2. Extracción y aislamiento de las antocianinas.....	216
9.2.3. Separación de las antocianinas aciladas.....	216
9.3. Técnicas cromatográficas.....	217
9.3.1. Cromatografía en capa delgada	217
9.3.2. Cromatografía de alta resolución en capa delgada (HPTLC, high-performance thin layer chromatography).....	217
9.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPCL), analítica y preparativa	218
9.4. Determinación estructural de las antocianinas aciladas.....	218
9.4.1. Métodos químicos	218
9.4.1.1. Hidrólisis alcalina.....	218
9.4.1.2. Hidrólisis ácida total.....	219
9.4.1.3. Hidrólisis ácida parcial	219
9.4.1.4. Oxidación degradativa de las antocianinas con agua oxigenada	219
9.4.2. Métodos espectroscópicos	219
9.4.2.1. Espectros UV-Vis.....	219
9.4.2.2. Espectroscopía infrarroja	220

9.4.2.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (^1H -RMN) y de carbono-13 (^{13}C -RMN).....	220
9.4.2.4. Espectrometría de masa (EM)	220
9.4.2.5. Cromatografía líquida-espectrometría de masa con ionización por electrospray (ESI, electrospray ionization) (CL.ESI-EM)	221
9.5. Características de las antocianinas estudiadas.....	221
9.6. Ensayo de estabilidad de las antocianinas <u>1-9</u>	221
9.7. Actividad antioxidante de las antocianinas <u>1-9</u> : Ensayo de actividad de captación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH $^{\cdot}$)	222
9.8. Estudio teórico y caracterización del espacio conformacional de antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas	222
9.8.1. Estudio conformacional.....	222
9.9. Análisis topológico y electrónico del espacio conformacional de antocianidinas y su relación con bioactividades.....	223
Capítulo 10. Conclusiones generales.....	225
Capítulo 11. Referencias	231
Anexo A. Estructuras de los conformeros de todas las antocianidinas en estudio.....	287
Anexo B. Tablas con parámetros físico-químicos de las antocianidinas en estudio.....	295
Anexo C. Publicaciones vinculadas a esta Tesis.....	305
Agradecimientos.....	307

Capítulo 1. Introducción

1.1. ¿Que son las antocianinas?

Las antocianinas o antocianinas (del griego *anthos* = flor y *kianos* = azul) son metabolitos secundarios y pigmentos fenolicos inocuos hidrosolubles que forman parte de la familia de los flavonoides. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Harborne, 1967, 1988; Harborne & Williams, 2000; Hemingway & Laks, 2012; Sakuta, 2014), donde ejercen importantes funciones como la dispersión de semillas, la polinización y el desarrollo de los órganos de las plantas (Saito & Harborne, 1992), pero también en su adaptación a diversos cambios de factores bióticos (ataques patogénicos) y abióticos (sequía, falta de nutrientes, luz de alta intensidad) (Gould *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2021). Es decir que, las antocianinas y otros flavonoides pueden ser importantes como elementos disuasorios de la alimentación para insectos, animales herbívoros y parásitos (*feeding deterrents*) (Johnson *et al.*, 2008), y en la protección contra los daños causados por la radiación UV y otros factores de estrés (Holton & Cornish, 1995; Passeri *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2023; Jan *et al.*, 2024).

Las mejores fuentes nutricionales de antocianinas son las bayas como las frutillas, los arándanos, las moras, las grosellas negras, las grosellas rojas y las frambuesas. El mayor contenido de antocianinas se encuentra en las bayas de saúco y las aronías. Otras buenas fuentes de antocianinas son: el maíz púrpura, las cerezas, las ciruelas, las granadas, las manzanas, las berenjenas, el vino, las uvas y las verduras de color rojo o púrpura, como los rábanos, las zanahorias negras, el repollo colorado, la coliflor púrpura, el maqui, el mirto y el açaí. Son responsables de los colores anaranjado brillante, rosa, rojo, violeta y azul en los pétalos de las flores como tulipanes, rosas y orquídeas, frutos y también en las raíces, tallos, tubérculos, hojas, brácteas, frutos y semillas, especialmente de las plantas vasculares (Dey & Harborne, 1993; Williams & Grayer, 2004; Wu *et al.*, 2006; de Pascual-Teresa *et al.*, 2008; He & Giusti, 2010; Neveu *et al.*, 2010; Wallace & Giusti, 2015; Du *et al.*, 2018; Fujiwara *et al.*, 2018; Aliaño-González *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Las antocianinas y sus derivados son los pigmentos responsables del color del vino tinto (He *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2023). Presentan fuerte absorción en la región UV-visible del espectro electromagnético. Todas estas características colocan a las antocianinas en segundo lugar en importancia, inmediatamente después de los pigmentos clorofílicos (Sinopoli *et al.*, 2019).

Se utilizan como colorantes alimentarios seguros, sin efectos adversos para los consumidores, a diferencia de muchos pigmentos sintéticos (Torskangerpoll & Andersen, 2005; Chou *et al.*, 2007; Gebhardt *et al.*, 2020; Pino & Vergara, 2022; Nabi *et al.*, 2023). Los carotenoides y las antocianinas se encuentran entre los colorantes vegetales más utilizados en la industria alimentaria (International Food Information Council and Foundation US Food & Drug Administration, 2004). Los carotenoides son liposolubles, estables y capaces de colorear los productos alimenticios de amarillo a rojo (Potter & Hotchkiss, 1995; Buchanan *et al.*, 2002); se obtienen principalmente de zanahorias, tomates y pimientos (Branen, 2001). Las antocianinas son menos estables que los carotenoides (Pazmino-Duran *et al.*, 2001).

En los últimos años, la mayoría de las investigaciones sobre antocianinas se han centrado en resolver este problema, así como en su purificación, identificación, análisis cuantitativo y distribución en plantas (Robards & Antolovich, 1997; Harborne & Williams, 1998, 2000; Antolovich *et al.*, 2000; da Costa *et al.*, 2000; Cooper-Driver, 2001; Liu *et al.*,

2020), efecto sobre el estrés de las plantas (Simmonds, 2003), seguimiento de cambios de color (Brouillard *et al.*, 2003; Wrolstad *et al.*, 2005), biosíntesis (Martens *et al.*, 2003; Springob *et al.*, 2003) y aplicaciones en alimentación (Giusti & Wrolstad, 2003), entre otros temas. En conjunto, la investigación estrictamente en química estructural de estos compuestos ha resultado ser escasa.

El consumo de antocianinas minimiza considerablemente la posibilidad de padecer enfermedades crónicas como las neuronales y cardiovasculares, obesidad y diabetes (Yang *et al.*, 2018; Mattioli *et al.*, 2020), entre otras, debido a su alta actividad antioxidante. Esta actividad da lugar a importantes propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas, que pueden usarse en la quimioprevención de las enfermedades mencionadas, así como en la anticarcinogénesis (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2003; Konczak & Zhang, 2004; Lule & Xia, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006; Enaru *et al.*, 2021a; Gonçalves *et al.*, 2021; Ockermann *et al.*, 2021; Sandoval-Ramírez *et al.*, 2022) y en la nutrición humana (Stintzing & Carle, 2004). Las antocianinas brindan la posibilidad de desarrollar productos con valor agregado, dado que se ha comprobado que promueven beneficios terapéuticos (Zhao *et al.*, 2011).

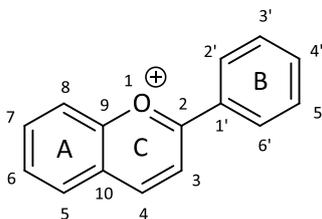
Las antocianinas tienen una desventaja importante, como es su baja estabilidad. La estabilidad de las antocianinas está influenciada por una serie de factores como el pH, la luz, la temperatura, la co-pigmentación, los sulfitos, el ácido ascórbico, el oxígeno, la complejación de iones metálicos y las enzimas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Enaru *et al.*, 2021a; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024). Trataremos la influencia de todos los factores mencionados sobre la estabilidad de las antocianinas y su degradación con el fin de minimizar su acción negativa y, posteriormente, potenciar sus efectos beneficiosos para la salud.

1.2. Estructuras químicas de las antocianinas

Las antocianidinas (o agliconas) poseen un anillo aromático **A** unido a un anillo heterocíclico **C** que contiene oxígeno que también está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático **B** (Konczak & Zhang, 2004; Brooks & Celli, 2019) (**Figura 1.1**). Las antocianidinas poseen una carga positiva, formando así una sal de oxonio, comúnmente denominada sal de flavilio, sal de 2-fenilcromilio o sal de 2-fenilbenzopirilio.

La aglicona se caracteriza por poseer varios sustituyentes que son grupos funcionales unidos a las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y/o 5'. Estos auxocromos (generalmente grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃)), tienen la propiedad de intensificar la acción de un grupo cromóforo (en este caso, -C=C- y anillos aromáticos) dentro de una misma estructura molecular, alterando tanto la longitud de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) como la intensidad ($\epsilon_{\text{máx}}$) de la absorción del cromóforo. Los grupos auxocromo tienen los siguientes efectos sobre los cromóforos: (a) *Desplazamiento batocrómico*. La absorción del cromóforo se desplaza hacia mayores longitudes de onda. (b) *Desplazamiento hipsocrómico*. La absorción del cromóforo se desplaza hacia menores longitudes de onda. (c) *Efecto hiperocrómico*. Aumenta $\epsilon_{\text{máx}}$, presentando la banda mayor intensidad. (d) *Efecto hipocrómico*. Decece $\epsilon_{\text{máx}}$, disminuyendo

la intensidad de absorción. Estas propiedades se manifiestan en los espectros UV-visible, los cuales se utilizan desde hace años para obtener las características estructurales de antocianidinas no identificadas.



<i>Antocianidina</i>	<i>C-3</i>	<i>C-5</i>	<i>C-6</i>	<i>C-7</i>	<i>C-3'</i>	<i>C-4'</i>	<i>C-5'</i>
<i>Apigeninidina</i>	H	OH	H	OH	H	OH	H
<i>Crisina</i>	H	OH	H	OH	H	H	H
<i>Quercetagetinidina</i>	OH	OH	OH	OH	H	OH	OH
<i>Pelargonidina</i>	OH	OH	H	OH	H	OH	H
<i>Cianidina</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
<i>Delfinidina</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
<i>Peonidina</i>	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
<i>Petunidina</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH	OCH ₃
<i>Malvidina</i>	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Calistefina Pelargonidina-3-*O*-glucósido

Cianina Cianidina-3,5-*O*-diglucósido

Kuromarina Cianidina-3-*O*-glucósido

Malvina Malvidina-3,5-*O*-diglucósido

Mirtalina Delfinidina-3-*O*-glucósido

Oenina Malvidina-3-*O*-glucósido

Figura 1.1. Numeración de los átomos de carbono de las antocianidinas, estructuras de las antocianidinas más comunes y otras, junto con los nombres de las antocianinas comunes (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024).

Hasta la fecha, se han aislado e identificado varias antocianidinas, siendo las más comunes aquellas que están trisustituidas en las posiciones 3, 5 y 7 (**Figura 1.1**). En algunos casos, también se han encontrado antocianidinas hidroxiladas en las posiciones 6 u 8, así como 3- y 5-desoxiantocianidinas (Harborne, 1966; Sousa *et al.*, 2016). Es relevante destacar que los grupos hidroxilo presentes en las posiciones 5 y 7 pueden estar *O*-metilados, lo cual influye en las propiedades físicas y químicas de las antocianinas.

Las antocianinas corresponden a los *O*-glucósidos de las antocianidinas; la posición más común de glicosilación es el OH-3 de la aglicona, generalmente mediante un enlace β-glicosídico, si hay más unidades de azúcar se unen a C-5 y C-7, y con menor frecuencia a C-3' y C-5' (**Figura 1.1**). Los azúcares pueden ser glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, o xilosa; el disacárido más común es la rutinosa (disacárido compuesto por *D*-glucosa y *L*-ramnosa con unión (1→6) interglicosídica) (Oancea & Draghici, 2013; Diaconeasa *et al.*, 2017). Las unidades de azúcar pueden estar aciladas con ácidos aromáticos, como el ácido

gálico, aunque generalmente con derivados del ácido cinámico, como los ácidos *p*-cumárico, sinápico, ferúlico y cafeico, pero también con una serie de ácidos alifáticos como el ácido acético, málico, malónico, succínico, oxálico y tartárico (**Figura 1.2**) (Clifford, 2000; Bakowska-Barczak, 2005; Pomilio & Mercader; 2017, Nassour *et al.*, 2020; Saha *et al.*, 2020; Houghton *et al.*, 2021).

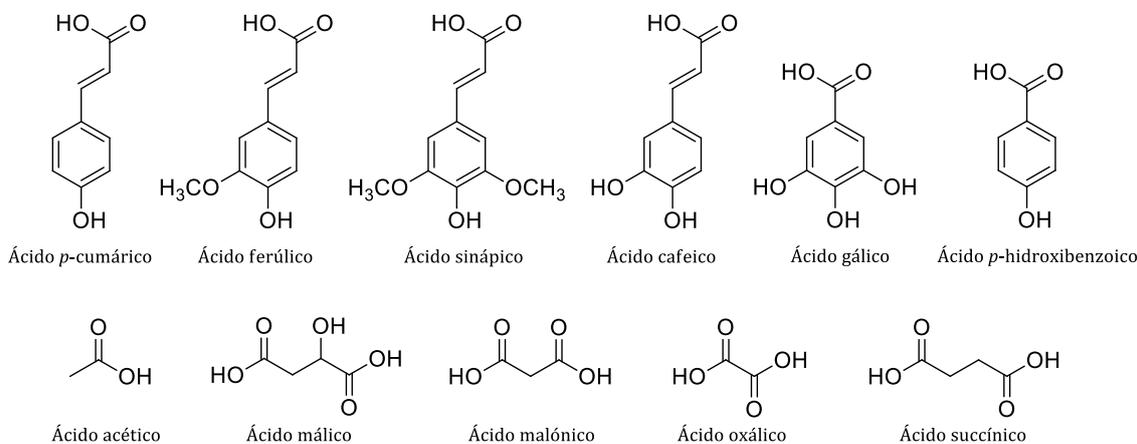


Figura 1.2. Ácidos orgánicos más comunes como agentes acilantes.

Existe una gran variedad de antocianinas diseminadas en la naturaleza, cuyas principales diferencias son el número de grupos hidroxilo, la naturaleza y el número de azúcares unidos a su estructura, los carboxilatos alifáticos o aromáticos unidos al azúcar y la posición de estos enlaces (Kong *et al.*, 2003; Andersen & Jordheim, 2006). La estructura de las antocianinas las hace dependientes de la composición y las condiciones de la solución en la que se disuelven. Además, las antocianinas pueden interactuar con otros compuestos, pero también entre sí, lo cual influye tanto en su color como en su equilibrio estructural (Fernandes *et al.*, 2015).

El color que presentan las antocianidinas y las antocianinas fue explicado por primera vez por Pauling en 1939, quien propuso que la estructura resonante del ion flavilio causaba la intensidad de su color (Wrolstad *et al.*, 2005).

De entre las 31 antocianidinas identificadas presentes en aproximadamente 700 antocianinas (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024), seis son las más comunes en las plantas vasculares: pelargonidina (Pg), cianidina (Cn), delphinidina (Df), peonidina (Pn), petunidina (Pt) y malvidina (Mv) (Clifford, 2000; Wallace & Giusti, 2019).

La distribución de las seis antocianidinas más comunes en flores, frutas y hortalizas es: Cn 50%, Df 12%, Pg 12%, Pn 12%, Pt 7% y Mv 7% (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; de la Rosa Reyna *et al.*, 2022; Pino & Vergara, 2022). Los glicósidos más extendidos en la naturaleza son los 3-*O*-monósidos, 3-*O*-biósidos, 3,5- y 3,7-*O*-diglicósidos. La presencia de 3-*O*-glicósidos es 2,5 veces más frecuente que la de los 3,5-*O*-diglicósidos y la antocianina más común es cianidina-3-*O*-glucósido (Kong *et al.*, 2003).

Cada una de estas antocianidinas se manifiesta fenotípicamente en la planta o fruto de un color característico. Por ejemplo, la pelargonidina aporta un color rojo vivo a las bayas, pero da a las flores un tono anaranjado, la delphinidina brinda un color azul-rojizo o violeta en plantas, muy común en maqui, y azul oscuro en varias petunias, y la cianidina da

una pigmentación púrpura rojiza (magenta) a flores y bayas, siendo abundante en especies como el saúco, la zanahoria púrpura y el maíz morado (Van Nocker & Ludwig, 2003). La petunidina es una antocianidina-*O*-metilada de color rojo oscuro o púrpura, que se encuentra en las grosellas negras y en las flores. La peonidina es otra antocianidina-*O*-metilada, que aparece en forma de pigmento magenta, que también se encuentra abundantemente en bayas, uvas y vinos tintos. La malvidina es una antocianidina-*O*-metilada, que aparece como un pigmento púrpura, que determina el color azul de ciertas flores, siendo el pigmento principal en los vinos tintos (Khoo *et al.*, 2017). Así, las antocianidinas cianidina, pelargonidina y delphinidina se encuentran a menudo en las frutas, mientras que en las flores las antocianidinas predominantes son la peonidina, la petunidina y la malvidina (Morata *et al.*, 2019).

Los *O*-glicósidos de las tres antocianidinas no metiladas (Cn, Df y Pg) son los más comunes en la naturaleza, encontrándose en el 80% de las hojas pigmentadas, el 69% de los frutos y el 50% de las flores (Dey & Harborne, 1993).

Los patrones de antocianinas presentes en diferentes especies de frutas han sido muy útiles para investigaciones quimiotaxonómicas y adulteraciones del vino (Goiffon *et al.*, 1999; Revilla *et al.*, 2001; Nørbæk *et al.*, 2002; García-Benítez *et al.*, 2003).

1.3. Biosíntesis o anabolismo de las antocianinas

El anillo B (C₆), junto con los átomos restantes (C₃) de la unidad C₆-C₃, se origina a partir de una unidad intacta de fenilpropano mediante la vía del ácido shikímico. La biosíntesis de los flavonoides, de la cual las antocianinas son parte, comienza con la condensación de un ácido cinámico activado, probablemente como éster de coenzima A (CoA), con tres moléculas de malonil-CoA, dando lugar al primer intermediario estable, la chalcona, que se encuentra en equilibrio con una flavanona. Por otro lado, la unidad C₆ del anillo A se forma por la condensación cabeza-cola de tres unidades de acetato, un proceso conocido como la vía del acetato-malonato (Holton & Cornish, 1995). Esta construcción biosintética da lugar a la diversidad estructural observada en las antocianinas.

La biogénesis de antocianinas se lleva a cabo en un segmento especial de la vía de los flavonoides, que está regulada en varios niveles. El primer paso es la conversión de la fenilalanina a ácido cinámico, y subsiguientemente, es transformado en el principal precursor de las antocianinas, 4-cumaróil-CoA, a través de una serie de reacciones catalizadas por las enzimas cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumaróil-CoA ligasa-(4CL) (**Figura 1.3**).

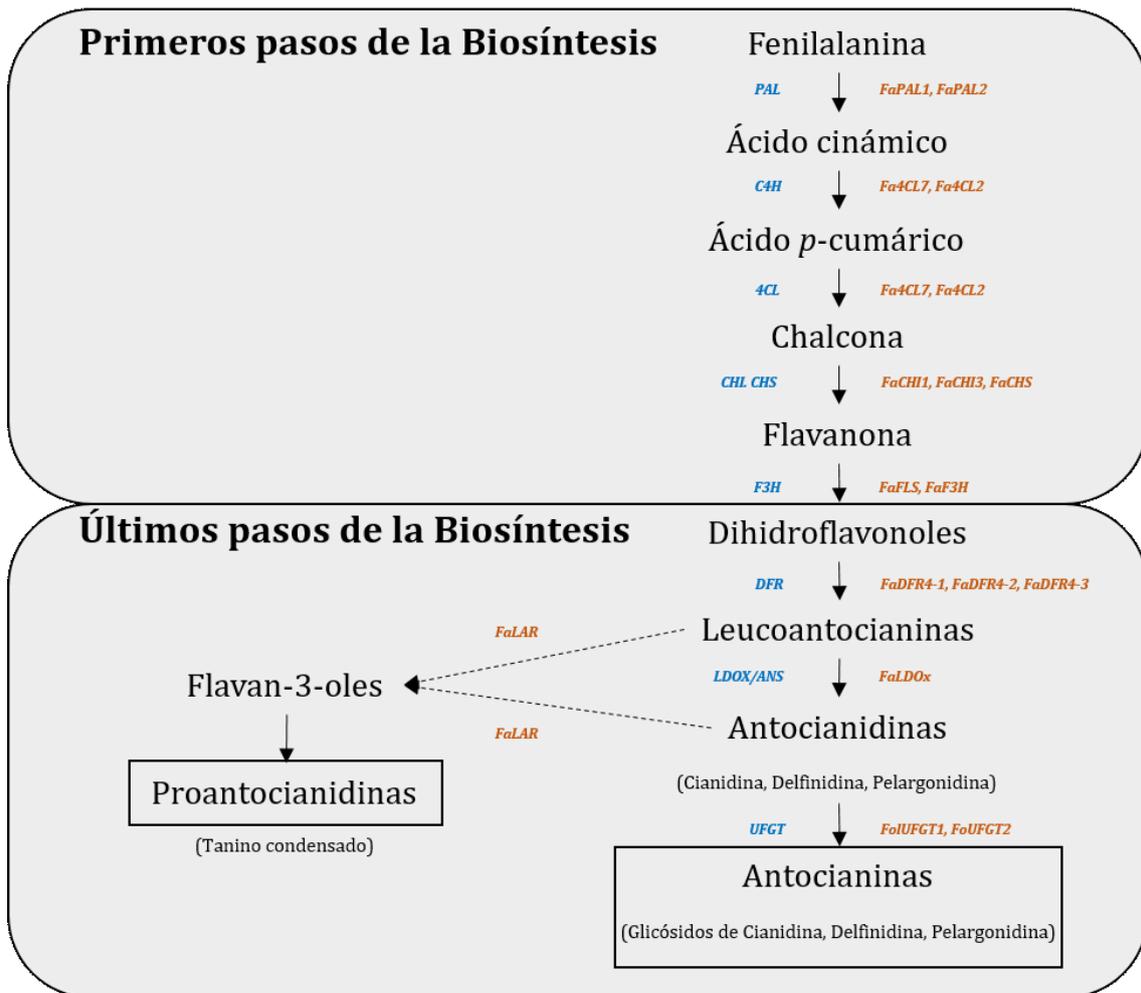


Figura 1.3. Biosíntesis de Antocianinas: Etapas temprana y tardía de la vía biosintética (Hichri *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018b).

En el siguiente paso se condensará una molécula de 4-cumaróil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA mediante la enzima chalcona-sintasa, dando lugar a las chalconas (Krishna *et al.*, 2017). Finalmente, tras una serie de reacciones enzimáticas, se producirán las principales antocianidinas (Bendokas *et al.*, 2019) (**Figura 1.4**). Esta biosíntesis tiene lugar en el citosol, y las antocianinas obtenidas serán transportadas a las vacuolas, donde se almacenarán como coalescencias coloreadas denominadas *inclusiones vacuolares antociánicas* (Flamini *et al.*, 2013).

Investigaciones recientes han concluido que la biosíntesis y acumulación de antocianinas se puede controlar regulando la expresión de ciertos genes, cambios epigenéticos en las plantas y cambios postraduccionales en las proteínas que coordinan la actividad de los factores de transcripción (Bendokas *et al.*, 2019). Además, las moléculas reguladoras (precursores y enzimas) de las vías biosintéticas y de la degradación influyen en la cantidad de antocianinas en diferentes regiones de la planta y en distintas plantas (Belwal *et al.*, 2020).

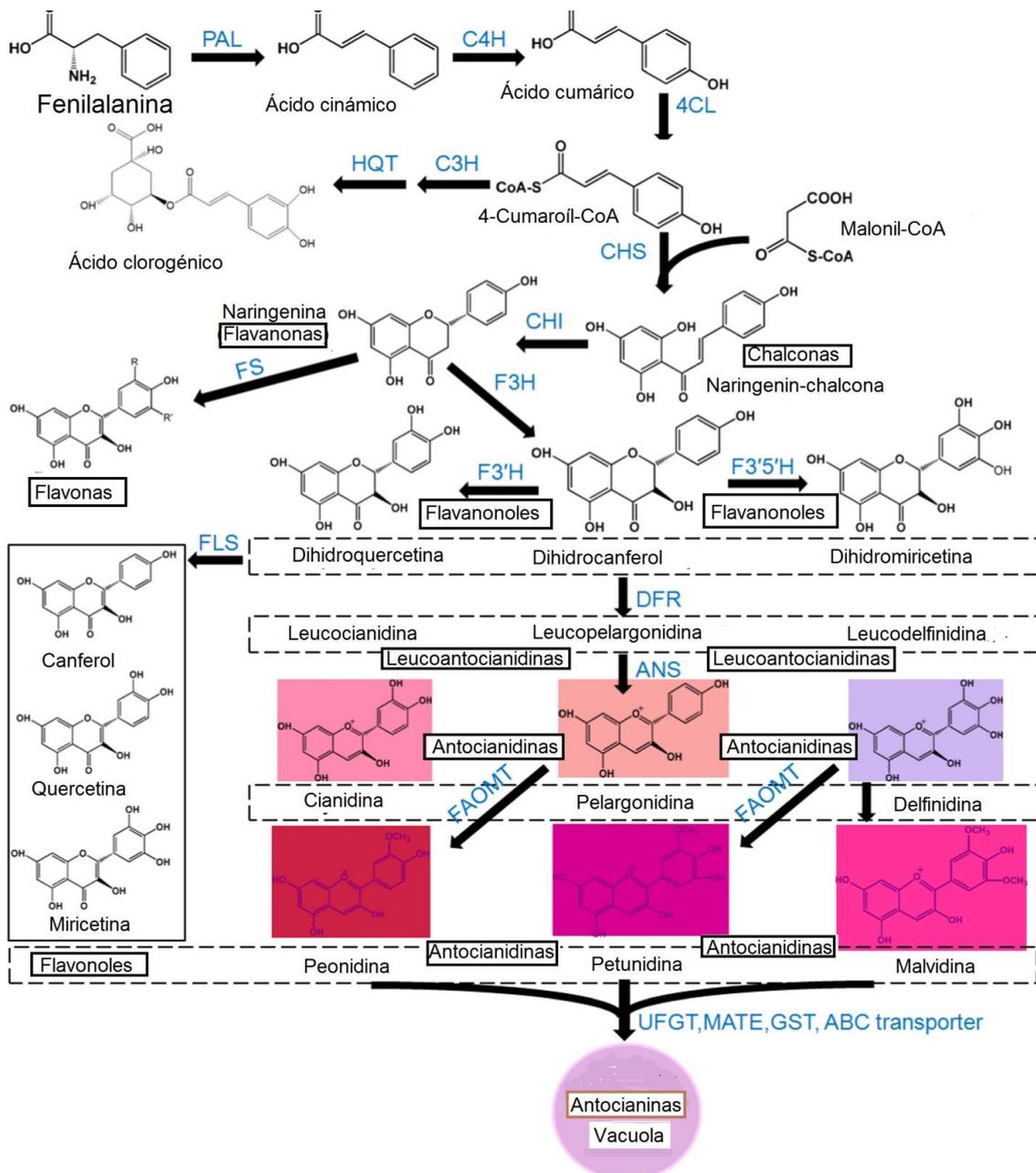


Figura 1.4. Esquema de las vías biosintéticas de las antocianinas. *CHS*, chalcona-sintasa; *CHI*, chalcona-isomerasa; *F3H*, flavanona-3-hidroxilasa; *F3'H*, flavonoide-3'-hidroxilasa; *F3'5'H*, flavonoide-3',5'-hidroxilasa; *DFR*, dihidroflavonol-4-reductasa; *ANS*, antocianidina-sintasa; *UFGT*, flavonoide-3-*O*-glucosiltransferasa; *FLS*, flavonol-sintasa.

Tanto las frutas como los vegetales rojos y azules son las principales fuentes de antocianinas, pero su contenido de antocianinas sufre variaciones importantes entre diferentes especies y dentro de la misma especie. Los factores que influyen en el contenido de antocianinas incluyen la variedad de planta, el clima, el área de cultivo, los procesos de cultivo, el período de cosecha, la maduración, la variabilidad estacional, el procesado y el almacenamiento, la luz y la temperatura (Mattioli *et al.*, 2020).

Las antocianinas se biosintetizan a través de la vía de los flavonoides a partir de dos tipos de genes: estructurales y reguladores (Petroni & Tonelli, 2011; de la Rosa Reyna *et al.*,

2022). Los *genes estructurales* juegan un rol indispensable en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas e influyen en los mecanismos de función de las enzimas fenilalanina-amoníaco-liasa (*PAL*), chalcona-sintasa (*CHS*), chalcona-isomerasa (*CHI*), flavanona-3-hidroxilasa (*F3H*), flavonoide-3'-hidroxilasa (*F3'H*), dihidroflavonol-4-reductasa (*DFR*), antocianidina-sintasa (*ANS*), uridin difosfato (UDP)-glucosa:flavonoide-3-*O*-glicosil-transferasa (*UFGT*) y glutatión-*S*-transferasa (*GST*) (Hossain *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018b).

La biosíntesis de antocianinas involucra dos etapas biosintéticas: temprana y tardía (**Figura 1.3**) (de la Rosa Reyna *et al.*, 2022). Estas dos etapas dan lugar a la biosíntesis de diferentes flavonoides como: taninos condensados, flavonoles y antocianidinas (Helander *et al.*, 1998). La biosíntesis de etapa temprana se inicia en la vía fenilpropanoide con la catálisis de la desaminación de la fenilalanina, mediante la enzima *PAL*, para producir ácido (*E*)-cinámico y cumaróil-CoA, seguido de la síntesis de chalcona que luego se isomeriza a flavanona por la enzima chalcona-isomerasa (*CHI*). La enzima flavanona-3-hidroxilasa (*F3H*) cataliza las flavanonas a dihidroflavonoles (Petroni & Tonelli, 2011). En la etapa tardía de la biosíntesis, la enzima dihidroflavonol-reductasa (*DFR*) reduce los dihidroflavonoles a leucoantocianinas, que a su vez, se convierten en antocianidinas por la enzima antocianidina-sintasa (*ANS*). Las antocianidinas finalmente se glicosilan a antocianinas mediante la enzima UDP-glucosa:flavonoide-3-*O*-glicosil-transferasa (*UFGT*) (Hichri *et al.*, 2011).

Las proteínas reguladoras tienen control sobre la biosíntesis de antocianinas y regulan la expresión de genes estructurales a nivel transcripcional y postranscripcional (Roy *et al.*, 2002). Estas proteínas reguladoras se modulan diferencialmente por el azúcar y las hormonas. Estudios previos sugieren que los azúcares sirven como señales esenciales para modular la biosíntesis de antocianinas. Un ejemplo es la sacarosa, la cual es la principal fuente de carbono para la síntesis de antocianinas y determina el sabor y calidad del fruto (Wang & Mazza, 2002). Por otra parte, las hormonas vegetales como auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido jasmónico y etileno, también tienen funciones importantes en la regulación de la biosíntesis de antocianinas. Éstas pueden estar asociadas a regular la madurez de frutos no climatéricos con respecto al ablandamiento de frutos y acumulación de antocianinas (Hichri *et al.*, 2011). Los factores de transcripción son reguladores esenciales para la expresión de genes estructurales en la biosíntesis de antocianinas, como: *MYB*, *bHLH*, *WRKY*, y *ERF*. Los factores de transcripción *MYB* asociados a la expresión de genes como *MYB39*, *MYB86*, *MYBIR*, *MYB10* y *MYB1*, regulan la coloración fenotípica de varios frutos. Es decir que los factores de transcripción reprimen o potencian la acumulación de antocianinas (Roy *et al.*, 2002). Además, los genes *bHLH* pueden interactuar con los genes *MYB* para regular la biosíntesis de proantocianidinas. Varios genes *bHLH* son los que responden a la biosíntesis de antocianinas en la fruta, como lo revelan los perfiles de expresión y análisis de redes (**Tabla 2.1**) (Hichri *et al.*, 2011).

Tabla 2.1. Genes reguladores, estructurales y biosintéticos de las antocianinas: Genes expresados en base a la función que ejercen en la biosíntesis de antocianinas (Hossain *et al.*, 2018).

Genes Reguladores		Genes Estructurales		Genes Biosintéticos de Antocianinas	
MYB	<i>FaMYB11</i>	Fenilalanina	<i>FaPAL1</i>	Dihidroflavonoles	<i>FaDFR4-1</i>
	<i>FaMYB1</i>		<i>FaPAL2</i>		<i>FaDFR4-2</i>
	<i>FaMYB10</i>	Ácido (<i>E</i>)-cinámico	<i>FaC4H</i>		<i>FaDFR4-3</i>
	<i>FaMYB5</i>		<i>FaCC1</i>	Leucoantocianidinas	<i>FaLDOX</i>
	<i>FaMYB9</i>	Cumaroil-CoA	<i>FaCL7</i>		<i>FaANR</i>
	<i>FaEOBII</i>		<i>FaCL2</i>		<i>FaLAR</i>
bHLH	<i>FabHLLH33</i>	Chalcona	<i>FaCHI3</i>	Antocianidinas	<i>FaUFGT1</i>
	<i>FabHLLH3-delta</i>		<i>FaCHI1</i>		<i>FaUFGT2</i>
	<i>FabHLLH3</i>		<i>FaCHIS</i>		
	<i>FabHLLH1</i>	Flavanona	<i>FaFLS</i>		
WD40	<i>FaWD40-1</i>		<i>FaF3H</i>		
	<i>FaWD-1</i>				
	<i>FaTTG1</i>				
	<i>FaWD44-1</i>				

1.3.1. Estudios bioinformáticos

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación utiliza un conjunto de tecnologías a fin de analizar grandes cantidades de ADN de forma simultánea y masiva. De esta manera, la investigación genómica es rápida y menos costosa y permite secuenciar un genoma humano completo en un día. Hasta la fecha, se han finalizado más de 150 genomas en plantas (Hytönen *et al.*, 2018). Por ejemplo, con las tecnologías de secuenciación *Illumina*, ha sido posible determinar características más específicas de los genomas de *Fragaria x ananassa* (frutillas) y *Rubus adenotrichos* (zarzamoras). El genoma de *Fragaria x ananassa* es del tamaño de 240 Mb, constituido por aproximadamente 34.809 genes, mientras que el genoma de *Rubus adenotrichos* es del tamaño de 243 Mb, constituido por aproximadamente 28.005 genes (Van Nocker & Ludwig, 2003).

La disposición de plataformas bioinformáticas aporta la oportunidad de registrar y almacenar datos de gran importancia para su consulta.

Como se ha visto, los principales reguladores transcripcionales genéticos de la vía biosintética de los flavonoides son los genes *MYB*, *WD40* y *bHLH*, que conforman en su totalidad el complejo denominado “*MBW*”, el cual es capaz de llevar a cabo funciones biológicas como: uniones al ADN, activación de expresión de genes diana y estabilización de reguladores transcripcionales (Helander *et al.*, 1998; Tsuda *et al.*, 2003; Akagi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

En resumen, los estudios bioinformáticos han permitido realizar análisis más exhaustivos entre distintas especies y ayudan a descifrar características o propiedades compartidas entre especies. De igual forma, las herramientas de secuenciación e identificación molecular son indispensables para el reconocimiento de genes y sus niveles

de expresión, lo cual han permitido el desglose de transcriptomas de especies que continúan desconociéndose en su totalidad.

1.4. Acerca de este trabajo de Tesis

Las antocianinas, como pigmentos vegetales naturales, poseen una amplia gama de actividades biológicas y muestran un gran potencial en aplicaciones clínicas y en el desarrollo de alimentos saludables. La mayoría de los estudios sobre la actividad biológica de las antocianinas se han basado en el consumo de frutas y verduras, o el uso de extractos y jugos naturales. Obtener estos compuestos aislados y puros sigue siendo un desafío, tanto experimental como económico.

Seleccionar un protocolo de extracción adecuado no es una decisión sencilla, ya que el contenido de antocianinas varía entre diferentes materiales vegetales, tienen una química compleja que depende del pH, son sensibles al calor, la luz y la oxidación, y pueden estar asociadas con otros compuestos. Seleccionar la técnica más apropiada para maximizar tanto el rendimiento como la estabilidad del extracto es un desafío. Además, al elegir los métodos de extracción, es crucial considerar varios factores, como los costos de inversión y operación, el impacto ambiental, la composición química de las muestras, el objetivo de la extracción y la aplicación prevista del extracto.

Como primera parte de esta Tesis, se propuso profundizar en la extracción y caracterización estructural de antocianinas complejas bioactivas mediante un estudio experimental de glicósidos acilados de antocianidinas presentes en el género *Ipomoea*, especie *Ipomoea cairica*, de la familia de las Convolvuláceas (**Capítulo 4**). Las antocianinas aciladas obtenidas e identificadas completamente por primera vez, muestran una marcada actividad antioxidante, la cual es fundamental para prevenir y tratar enfermedades crónicas.

La segunda parte de esta Tesis consiste en un estudio detallado y exhaustivo de la relación entre la estructura electrónica y conformacional de las antocianidinas y su capacidad antioxidante y antimutagénica (**Capítulos 5 y 6**). Si bien se han realizado estudios sobre antociani(di)nas, la mayoría son de naturaleza empírica y carecen de un fundamento fisicoquímico profundo que permita evaluar la estabilidad y la actividad biológica de estos compuestos. Por esta razón, en esta Tesis hemos abordado por primera vez la investigación de seis antocianidinas en todo el espacio conformacional.

El estudio de las antocianidinas en su forma de catión flavilio es especialmente relevante debido a su alta reactividad, la cual se traduce en una notable actividad biológica. Es crucial señalar que, en su forma estabilizada, las antocianidinas no se encuentran aisladas. Sin embargo, su estructura en forma de ion flavilio, caracterizada por una carga positiva, les confiere una alta reactividad. Este aspecto particular de las antocianidinas es otro de los puntos principal de estudio en esta Tesis, ya que comprender y desentrañar la relación entre su estructura y su reactividad es fundamental para develar su papel en diversos procesos biológicos.

La tercera parte de este trabajo de Tesis involucra la predicción original de ciertas bioactividades de gran interés, como la antioxidante, antimutagénica y antitumoral, a través de modelos QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) (**Capítulo 7**). Este estudio permite relacionar de manera cuantitativa las diferentes actividades biológicas con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. A pesar de los numerosos informes sobre la actividad biológica de las antocianinas, los mecanismos subyacentes siguen sin comprenderse completamente en muchos aspectos. Aunque la teoría QSAR se utiliza principalmente como un enfoque predictivo, también puede ofrecer valiosa información sobre cómo las características estructurales influyen en las actividades biológicas, facilitando así una mejor comprensión intrínseca de las mismas y de las metodologías utilizadas.

Como etapa final de este trabajo de doctorado (**Capítulo 8**), se presentan los estudios *in vitro* y ensayos clínicos en humanos de antociani(di)nas dietarias, evaluando su capacidad para la prevención y el manejo de la osteoartritis y las comorbilidades crónicas como el sobrepeso o la obesidad.

Las antocianinas han captado la atención tanto de la comunidad científica como de la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus bioactividades, sus potenciales beneficios para la salud y sus diversas aplicaciones comerciales. De esta manera, con el desarrollo de las temáticas presentadas, se ha podido cumplir con los objetivos de esta Tesis y desplegar diferentes aspectos de la Química de estos interesantes compuestos bioactivos.

Capítulo 2. Biodisponibilidad y estabilidad de las antocianinas

2.1. Biodisponibilidad y actividad biológica de las antocianinas

Los alimentos ricos en antocianinas se incluyen entre los denominados alimentos funcionales debido a sus propiedades nutraceuticas (Khoo *et al.*, 2017). La ingesta oral de frutas ricas en antocianinas, así como de extractos o compuestos puros, ha demostrado ser eficaz en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, como trastornos cardiovasculares, neurodegenerativos, diabetes, artritis y cáncer, gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001; Ross & Kasum, 2002; Tsuda *et al.*, 2003; Einbond *et al.*, 2004; McDougall *et al.*, 2005; Jaganath, A. Crozier, 2010; Putta *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018), tal como se ha demostrado en estudios epidemiológicos (Rechner & Kroner, 2005; Wang & Stoner, 2008) y en estudios clínicos (Pomilio *et al.*, 2024). Además, se ha observado que la administración de antocianinas puede mejorar significativamente la agudeza visual, ya que estos pigmentos son capaces de potenciar la visión nocturna y general (Lila, 2004).

Para que estos compuestos bioactivos logren un efecto en un tejido específico, es fundamental su biodisponibilidad, es decir, que sean absorbidos eficientemente desde el estómago o intestino hacia la circulación sistémica y transportados a la zona adecuada (McDougall *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2009).

Algunos aspectos relacionados con la biodisponibilidad y la actividad antioxidante se abordan en el presente trabajo de Tesis.

2.1.1. Biodisponibilidad de las antocianinas

La información sobre la absorción, el metabolismo, la distribución en tejidos y órganos, y la excreción de las antocianinas en humanos sigue siendo incompleta debido a la complejidad de los ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Esta situación se ve agravada por factores como los altos costos, la necesidad de observación a largo plazo, las variaciones entre individuos y la dificultad de diseñar experimentos adecuados que eviten resultados contradictorios (McDougall *et al.*, 2005; Jing & Giusti, 2013).

La biodisponibilidad, la bioabsorción, la distribución tras la absorción, los mecanismos de transporte y el metabolismo de las antocianinas en animales y humanos se han investigado previamente en estudios *in vitro* e *in vivo* (Felgines *et al.*, 2003; Prior & Wu, 2006; McGhie & Walton, 2007; Fang, 2014). Algunos estudios han señalado que las concentraciones de antocianinas utilizadas en ensayos *in vitro* son demasiado bajas para contribuir a la inhibición *in vivo* de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, podrían ser adecuadas para influir en la transducción de señales y en la expresión génica (Milbury *et al.*, 2010). En lo que respecta a la absorción y el metabolismo de las antocianinas, estos glicósidos pueden ser absorbidos rápidamente en el estómago y el intestino delgado después de la ingestión, ingresando en la circulación sistémica tras pasar por el hígado, donde pueden ser metabolizados mediante reacciones de metilación y glucuronidación (Passamonti *et al.*, 2003; McGhie & Walton, 2007).

Se ha detectado la presencia de antocianinas, sus agliconas y tanto los derivados metilados como los glucurónidos de antocianinas en tejidos como el estómago, intestino delgado, hígado, bilis, riñones, pulmones y ojos. No obstante, en algunos órganos como los ojos y el cerebro, la presencia de antocianinas fue transitoria y, en algunos casos, en cantidades muy pequeñas (Espín *et al.*, 2007). Las metodologías actuales para la detección de antocianinas y sus metabolitos en sangre, orina y tejidos incluyen la cromatografía líquida de alta resolución, la espectrometría de masa (EM) y masa tándem (EM/EM), y la resonancia magnética nuclear protónica y de ^{13}C (^1H - y ^{13}C -RMN) (Jing & Giusti, 2013; Liu *et al.*, 2018a).

En ratas, los glicósidos de antocianinas son absorbidos de manera rápida y eficiente en el intestino delgado, siendo luego metabolizados y excretados por bilis y orina tanto en su forma intacta como en formas metiladas y como glucurónidos (Talavéra *et al.*, 2004). Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la importancia de la estructura de la aglicona en el metabolismo de las antocianinas (Prior & Wu, 2006). Por ejemplo, en un experimento con ratas, se observó que la pelargonidina-3-*O*-glucósido fue rápidamente absorbida tanto en el estómago como en el intestino delgado, de manera similar a la cianidina-3-*O*-glucósido. Sin embargo, en la etapa de catabolización, la pelargonidina-3-*O*-glucósido fue glucuronidada en mayor medida que la cianidina-3-*O*-glucósido (Galvano *et al.*, 2004; Felgines *et al.*, 2007).

Si bien Borges *et al.* (2007) consideraron la posibilidad de que la formación de la pseudobase o la base quinoidal de las antocianinas pudiera ocurrir debido a cambios de pH en el tracto gastrointestinal, siendo la pseudobase carbinol incolora la forma predominante en el intestino delgado donde su absorción es muy limitada, posteriormente se encontró que las antocianinas pasan, en gran medida, del intestino delgado al intestino grueso sin biotransformación en humanos con colon intacto (González-Barrio *et al.*, 2010). La aglicona liberada tras la escisión de la unidad 3-*O*-glicosídica es muy inestable en condiciones fisiológicas y puede ser degradada por reacciones químicas o por la acción de bacterias del colon, produciendo ácidos fenólicos y aldehídos mediante la interrupción del anillo C (Galvano *et al.*, 2007).

Por ejemplo, se ha identificado el ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico) como el principal metabolito de la cianidina-3-*O*-rutinosido, tanto *in vitro* por la microbiota fecal humana como *in vivo*, representando aproximadamente el 40% de la cianidina-3-*O*-glucósido ingerida en la corriente sanguínea a las seis horas post-consumo (Vitaglione *et al.*, 2007). El ácido protocatéquico, al igual que las antocianinas, exhibe propiedades antioxidantes, antilipídicas y antiinflamatorias (Vitaglione *et al.*, 2007; Forester & Waterhouse, 2008).

2.1.2. Propiedades biológicas de las antocianinas

Estudios realizados en líneas celulares del tracto gastrointestinal (Bowen-Forbes *et al.*, 2010; Rugina *et al.*, 2012; Hafidh *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Bishayee *et al.*, 2016), modelos animales (Jiang *et al.*, 2014) y ensayos clínicos en humanos (Pomilio *et al.*, 2024) han demostrado que las antocianinas poseen funciones antioxidantes, bacteriostáticas, antiinflamatorias, antienvjecimiento y anticancerígenas (Bagchi *et al.*,

2004; Bobe *et al.*, 2006; Wang & Stoner, 2008; He & Giusti, 2010; Joshi & Goyal, 2011; Miguel, 2011; Chen *et al.*, 2017a; Lin *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2018).

Las antocianinas han mostrado ser eficaces en la prevención de diversas enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares (Alvarez-Suarez *et al.*, 2014; Cerletti *et al.*, 2017), diabetes y obesidad (Wu *et al.*, 2013b; Li *et al.*, 2015; Pomilio *et al.*, 2024), además de contribuir al retraso del envejecimiento y disminuir el riesgo de trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer (Ames *et al.*, 1993; Nikkhah *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2017). Los efectos antitumorales de las antocianinas se basan en una amplia gama de actividades biológicas: antioxidante, antiinflamatoria, antimutagénica, antiangiogénica, inducción de la diferenciación celular e inhibición de la proliferación mediante la modulación de las vías de transducción de señales. Estas actividades conducen a la interrupción del ciclo celular y a la estimulación de la apoptosis o la autofagia en células cancerosas (Bishayee *et al.*, 2016). Además, las antocianinas presentan acción antiinvasiva y antimetastásica, revirtiendo la resistencia de las células cancerosas a los fármacos y aumentando su sensibilidad a la quimioterapia (Lin *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que las antocianinas inhiben el crecimiento de células malignas, estimulan la apoptosis y modulan eventos de señalización oncogénica *in vitro* en un rango de concentración de 10^{-6} a 10^{-4} M (Wang & Stoner, 2008).

2.2. Estabilidad de las antocianinas

A pesar del gran potencial de aplicación como pigmentos naturales que tienen las antocianinas para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Khoo *et al.*, 2017), su uso es aún limitado debido a su relativa inestabilidad que se ve fácilmente influenciada por un amplio rango de parámetros, como: la humedad relativa, la luz, el pH, la temperatura, los azúcares (acilados y no acilados), la vitamina C, los niveles de oxígeno, el dióxido de azufre o sulfitos, las enzimas, los co-pigmentos y los iones metálicos (Sharma *et al.*, 2016). Así, estos factores y procesos producirán cambios en la concentración y bioactividad de las antocianinas, y también en el color, lo que afectará el grado de aceptación de la sustancia por parte del consumidor (Aprodu *et al.*, 2020).

En los últimos años, varios estudios se han centrado en la biodisponibilidad de las antocianinas, comprobando que sería inferior al 1% y que depende de la unidad glicosídica; por lo tanto, las antocianinas no aciladas se absorben de manera más eficiente que las aciladas (Yousuf *et al.*, 2015). Sin embargo, la baja biodisponibilidad se logra superar mediante la encapsulación de las antocianinas (Ozkan *et al.*, 2019).

En cuanto a la estabilidad relativa de antocianidinas y antocianinas, los glicósidos son más estables que las agliconas. Es decir que, la glicosilación aumenta la estabilidad y la solubilidad en agua de las antocianidinas. El aumento del número de unidades de azúcar parece aumentar aún más la estabilidad de las antocianinas, lo que se explica por la mayor estabilidad de la red de puentes de hidrógeno intramoleculares dentro de la unidad de azúcar y entre el azúcar y la aglicona (Zhao *et al.*, 2014; Hocine *et al.*, 2018). En el caso de

las antocianinas aciladas, la acilación del glicosilo de las antocianinas por ácidos alifáticos y aromáticos aumenta aún más su estabilidad (Zhao *et al.*, 2017).

La estabilidad de las antocianinas se puede modificar de tres maneras: por polimerización, escisión y derivatización. La escisión o clivaje de las antocianinas da como resultado compuestos incoloros, la polimerización causa pardeamiento y las reacciones de derivatización producen varias moléculas de diferentes colores (Weber & Larsen, 2017).

La baja estabilidad de las antocianinas es una desventaja importante para su aplicabilidad. Para mejorar esta condición, se deben tener en cuenta los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas, así como su degradación, los cuales serán abordados en la siguiente sección.

2.3. Factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas aisladas son muy inestables y muy susceptibles a la degradación (Giusti & Wrolstad, 2003). Su estabilidad se ve afectada por diversos factores como el pH, la temperatura de almacenamiento, la estructura química, la concentración, la luz, el oxígeno, los solventes, la presencia de enzimas, flavonoides, proteínas y iones metálicos (Rein, 2005).

La estabilización química de las antocianinas es el principal foco de investigación debido a sus potenciales aplicaciones, sus efectos beneficiosos y su uso como alternativa a los colorantes artificiales (Rein, 2005).

La estabilidad de las antocianidinas está influenciada por los sustituyentes del anillo B y la presencia de grupos hidroxilo o metoxilo adicionales que disminuyen la estabilidad de la aglicona en medios neutros; por lo tanto, pelargonidina es la antocianidina más estable (Fleschhut *et al.*, 2006). A diferencia de las agliconas, los monoglicósidos y, sobre todo los diglicósidos, son más estables en condiciones de pH neutro (Fleschhut *et al.*, 2006). Este comportamiento se explica porque las unidades de azúcar evitan la degradación de intermediarios inestables en ácido fenólico y aldehído (Fleschhut *et al.*, 2006) (**Figura 2.1**).

Las investigaciones sobre la estabilidad de las antocianinas y la variación del color con el pH llevan a la conclusión que los cambios en el color de estos compuestos son más significativos en la región alcalina debido a su inestabilidad (Cabrita *et al.*, 2000).

2.3.1. Efectos de la concentración de antocianinas y solventes

Investigaciones con sales de flavilio sintéticas en diferentes soluciones (acetonitrilo : agua, etanol, propilenglicol, dioxano y 2-butanona) han demostrado que los cambios de color dependen del solvente y de la concentración de esas sales de flavilio (Ito *et al.*, 2002). En solventes próticos las sales de flavilio sintéticas presentan una coloración roja, mientras que en solventes apróticos las soluciones son amarillas. Este hecho se ha explicado proponiendo que las especies roja y amarilla corresponden a un monómero y dímero

respectivamente; por tanto, al aumentar la concentración de sales de flavilio sintéticas, se favorece la coloración roja.

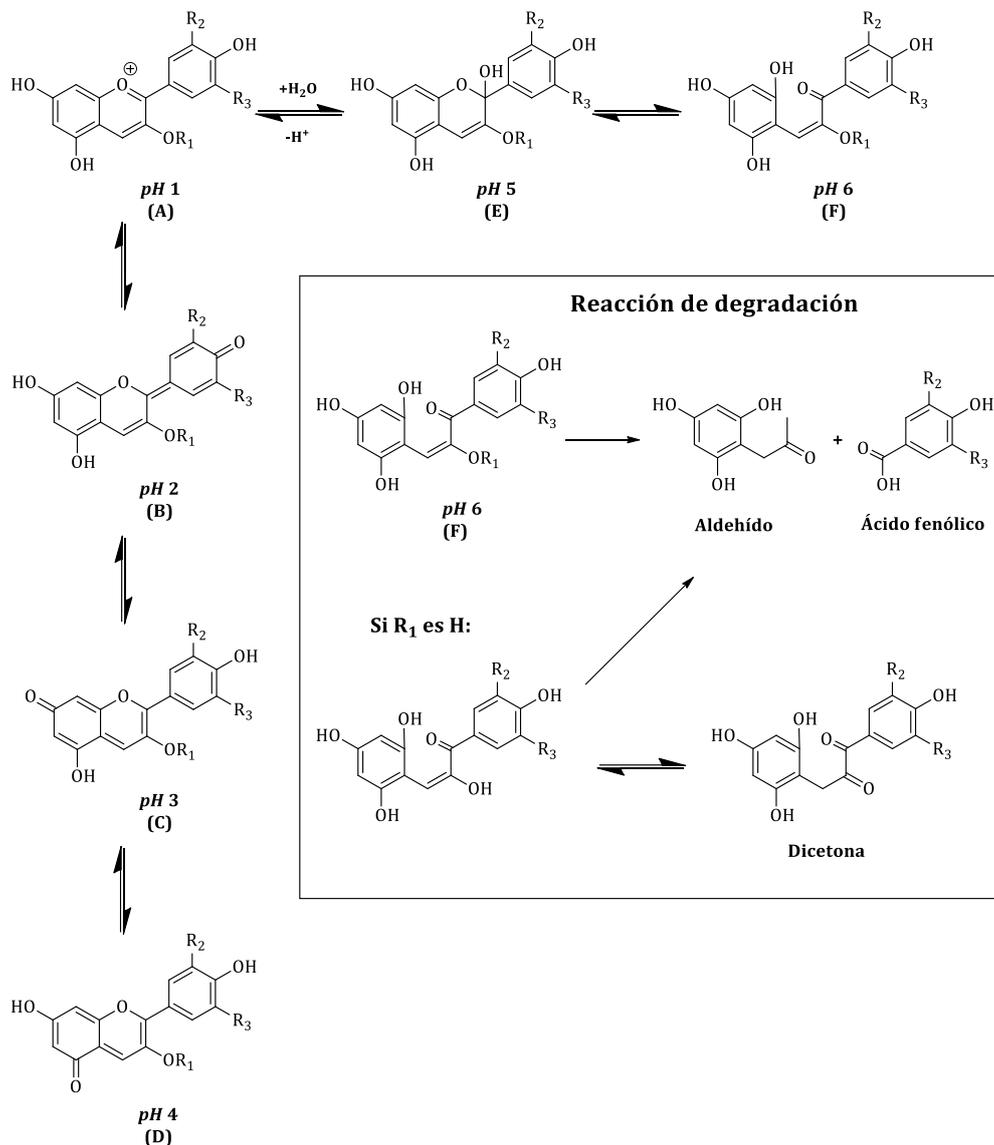


Figura 2.1. Formas químicas de las antocianidinas en función del pH y reacción de degradación de las antocianidinas. Donde $R_1 = H$ o sacárido, R_2 y $R_3 = H$ o metilo.

También se observó que al aumentar la proporción de agua, en mezclas acetonitrilo : agua, el monómero se transforma en un dímero de color verde (transferencia de carga). Así, el agua tiene una función fundamental en la dimerización de las sales de flavilio debido a que éstas tienen que neutralizar sus propias repulsiones electrostáticas con las moléculas de agua para que la dimerización pueda llevarse a cabo.

2.3.2. Influencia del pH

Las antocianidinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas que dependen del pH de la solución (**Figura 2.1**) (da Costa *et al.*, 1998; Heredia *et al.*, 1998; Kennedy & Waterhouse, 2000; Fleischhut *et al.*, 2006). En un ambiente ácido, a $pH = 1$, el catión flavilio

(color rojo) es la especie predominante y muy soluble en agua (Cooper-Driver, 2001; Khoo *et al.*, 2017), que contribuye a los colores púrpura y rojo (**Figura 2.1 A**). A valores de pH entre 2 y 4, predominan las especies azules quinoidales (**Figura 2.1 B-D**), mientras que a un pH entre 5-6, sólo se pueden observar dos especies, que son una pseudobase carbinólica incolora (**Figura 2.1 E**) y una chalcona de color amarillo pálido (**Figura 2.1 F**) (Kang *et al.*, 2021). Cuando aumenta el pH, también aumenta la cantidad de base anhidra (Cooper-Driver, 2001), pero a pH superior a 7, las antocianidinas se degradan en función de sus sustituyentes (**Figura 2.1**) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

A valores de pH entre 4 y 6, coexisten cuatro formas de antocianidinas: catión flavilio, base quinoidal anhidra, base carbinólica incolora y la chalcona de color amarillo pálido. El equilibrio entre las bases quinoidales y el carbinol se produce a través del catión flavilio, tal como se muestra en la **Figura 2.1** (estructuras **D**, **A** y **E**) y en la **Figura 2.2** (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Pina *et al.*, 2011).

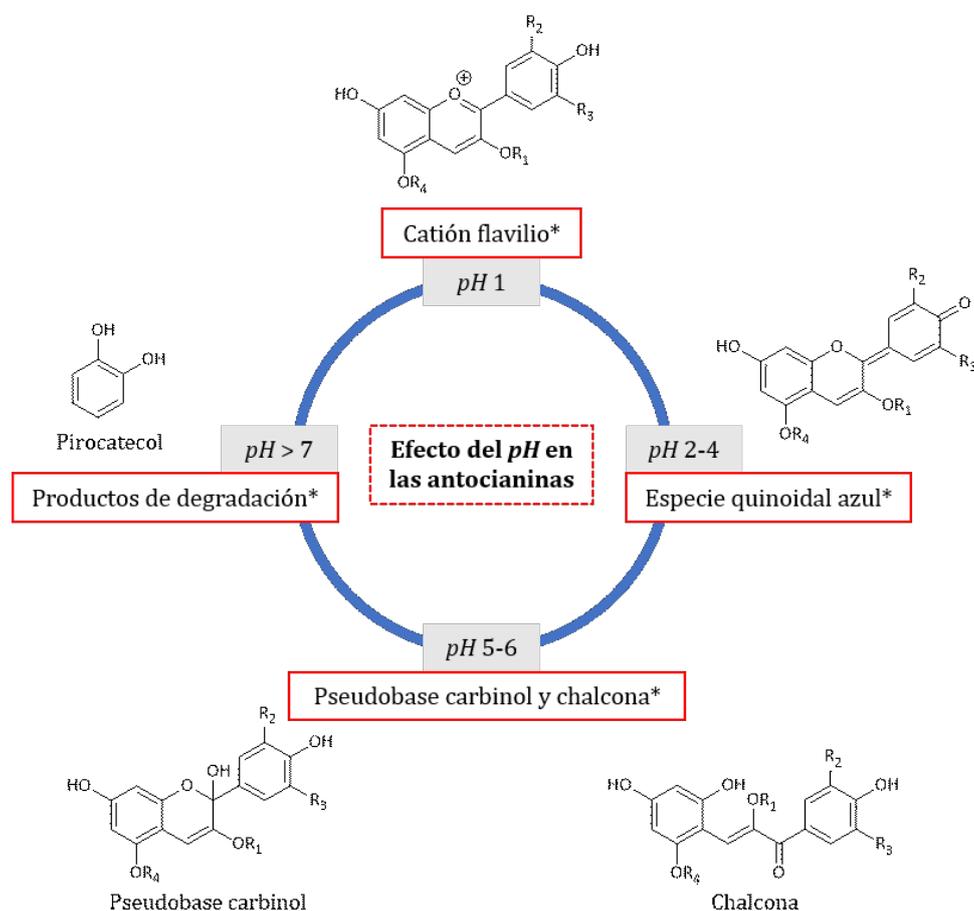


Figura 2.2. Antocianinas a diferentes valores de pH; * forma química predominante (Riaz *et al.*, 2016).

En cuanto a la influencia estructural, los sustituyentes del anillo B y la presencia de grupos hidroxilo o metoxilo adicionales son responsables de la estabilidad de las antociani(di)nas, que en ambientes neutros disminuyen la estabilidad de las agliconas. Por otro lado, los mono- y diglicósidos son más estables en un ambiente neutro que las agliconas, debido a que las unidades de azúcar evitarán la degradación de intermediarios

inestables en aldehído y ácido fenólico (**Figura 2.1**) (Fleschhut *et al.*, 2006; Weber & Larsen, 2017).

En resumen, la estabilidad de las antocianinas aumenta con el aumento de la metilación y disminuye con un número creciente de grupos hidroxilo en el anillo B de las antocianidinas. La acilación desempeña un rol importante en la mejora de la estabilidad de las antocianinas (Fei *et al.*, 2020).

2.3.3. Temperatura

Como es bien sabido, el tratamiento térmico es uno de los métodos más utilizados para conservar y prolongar la vida útil de los alimentos y garantizar la seguridad alimentaria (Enaru *et al.*, 2021). Por lo tanto, dependiendo de los parámetros funcionales del alimento y la vida útil deseada por el fabricante, el tratamiento térmico puede tener lugar a temperaturas entre 50-180°C. Debido a este procesado a alta temperatura durante cierto tiempo, se producen cambios en el color, la cantidad de antocianinas, así como también en la capacidad antioxidante de los alimentos (Aprodu *et al.*, 2020). Las antocianinas a esas temperaturas, pueden sufrir: glicosilación, ataque nucleofílico del agua, clivaje y polimerización que provocarán su pérdida y degradación (Laleh *et al.*, 2005, Rodríguez-Amaya, 2019), y el pardeamiento de los productos en presencia de oxígeno (Riaz *et al.*, 2016). Tanto la intensidad del color determinada por las antocianinas monoméricas como su cantidad disminuyen en función del tiempo/temperatura, mientras que la cantidad de pigmentos marrones/fracción polimérica aumenta. Es decir, la estabilidad disminuye con el aumento de la temperatura.

Las investigaciones actuales han demostrado que la estabilidad de estos compuestos está estrechamente relacionada con su estructura química, donde la unidad de azúcar es un factor importante (Remini *et al.*, 2018). Las antocianinas aciladas almacenadas a diferentes temperaturas, mostraron mayor estabilidad que las antocianinas no aciladas (Turker *et al.*, 2004). Se analizó la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de antocianinas y su vida media ($t_{1/2}$) fue considerablemente más corta a temperatura ambiente que en almacenamiento en frío en todos los jugos examinados. Por lo tanto, se recomienda evitar almacenarlos a temperatura ambiente (Hellström *et al.*, 2013).

Por otro lado, investigaciones sobre extractos de uvas mostraron que el tratamiento térmico a 35°C redujo el contenido total de antocianinas a menos de la mitad, comparado con el mismo extracto de uvas que fue sometido a un tratamiento térmico de sólo 25°C. Además, el color de las antocianinas cambió de rojo a anaranjado hasta temperaturas de 40°C, fenómeno observado en un ambiente con pH ácido, que no influyó en este cambio (West & Mauer, 2013).

Los procesos térmicos que requieren altas temperaturas como el escaldado y la pasteurización a 95°C por 3 min para obtener puré de arándanos, provocaron una pérdida del 43% de las antocianinas monoméricas totales, en comparación con la cantidad observada en la fruta fresca antes del tratamiento térmico. Cabe señalar que mientras la cantidad de antocianinas disminuyó, los valores de los colores poliméricos aumentaron del 1% al 12%. Este hallazgo implica que los parámetros termolábiles pueden promover la

degradación de las antociani(di)nas, y respalda la teoría de que su destrucción en el procesado de los jugos es causada por enzimas endógenas en las frutas (Patras *et al.*, 2010). Si bien hasta ahora se ha demostrado que el tratamiento térmico tiene un efecto negativo sobre la cantidad de antocianinas en frutas y vegetales, aún puede tener un efecto beneficioso. Los polifenoles, es decir, implícitamente antocianinas, son degradados enzimáticamente por la enzima polifenol-oxidasa, pero esta enzima puede inactivarse térmicamente (Patras *et al.*, 2010, Deylami *et al.*, 2016). En consecuencia, en el sector de procesado de alimentos, el escaldado o tratamiento térmico corto y suave de las materias primas puede disminuir la oxidación de las antocianinas por la enzima polifenol-oxidasa (Khoo *et al.*, 2017), mejorando así la estabilidad de las antocianinas (He, 2008; Deylami *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, la degradación térmica se puede prevenir disminuyendo el valor de pH de la solución de antocianinas y la concentración de oxígeno (Rein, 2005; Sipahli *et al.*, 2017).

2.3.4. Oxígeno

Debido a la estructura química insaturada de las antocianinas, estos compuestos son susceptibles a la reacción con oxígeno molecular (Sikorski, 2018; Enaru *et al.*, 2021). La presencia de oxígeno puede acelerar el proceso de degradación de las antociani(di)nas de dos maneras: por un mecanismo oxidativo directo o por la acción de enzimas oxidantes (Patras *et al.*, 2010).

Numerosos estudios han demostrado que la estabilidad de las antocianinas aumenta cuando se almacenan al vacío, bajo nitrógeno o bajo argón, en comparación con su almacenamiento en una atmósfera predominantemente con oxígeno (Remini *et al.*, 2018). La alta temperatura y la presencia de oxígeno han demostrado ser la combinación más dañina de todos los factores que influyen en la estabilidad de estos compuestos (Cavalcanti *et al.*, 2011). Desde hace muchos años se sabe que llenar completamente las botellas con jugo caliente de uvas puede posponer la degeneración del color de púrpura a marrón opaco; lo mismo ocurre con otros jugos (Sikorski, 2018).

Por otro lado, si los alimentos se almacenan en un ambiente enriquecido con 60-100% de oxígeno y a baja temperatura, al inicio (0-7 días) del almacenamiento en frío, el contenido de fenoles y antocianinas aumenta. Este efecto, sin embargo, disminuye con el tiempo de almacenamiento (Cavalcanti *et al.*, 2011).

2.3.5. Luz

Las plantas están expuestas a la luz, que estimula la síntesis y acumulación de antocianinas, por lo tanto, la luz es otro parámetro importante en su estabilidad (Sikorski, 2018). La luz es necesaria para la producción de antocianinas, pero también acelera su descomposición (Cavalcanti *et al.*, 2011). Además, la cantidad de oxígeno molecular presente afecta la tasa de descomposición inducida por la luz. Cabe mencionar que con luz fluorescente la pérdida de antocianinas es más intensa (Remini *et al.*, 2018).

Las antocianinas son responsables de los colores en muchas plantas, ya que son buenos absorbentes de la luz visible. Por lo tanto, el color está influenciado principalmente por el patrón de sustitución del anillo B de la aglicona, a diferencia del patrón de glicosilación, que afecta la producción de color en menor medida (Remini *et al.*, 2018).

Se estudió el impacto de la luz en la estabilidad de los extractos de antocianinas de varias fuentes biológicas. En el caso del jugo de uvas almacenado a 20°C en la oscuridad, se observó que se destruyó aproximadamente el 30% de la cantidad de antocianinas. Al colocar esas muestras en presencia de luz a la misma temperatura y duración se eliminó casi la mitad de los pigmentos totales (Amogne *et al.*, 2020).

La luz también afecta la actividad antioxidante de las antocianinas. Este hecho es relevante en la industria alimentaria, dado que por su carácter antioxidante las antocianinas son beneficiosas contra las enfermedades cardiovasculares y otras, por lo cual contribuyen a los alimentos funcionales (Rein, 2005; Van Hung, 2016). Se observó una disminución significativa del contenido de antocianinas y de la actividad antioxidante en extractos de moras almacenados a temperatura ambiente y expuestos a luz fluorescente durante 10 horas. Por lo tanto, cuanto más prolongada sea la exposición del extracto a la luz, más disminuirá el contenido de antocianinas y su actividad antioxidante (Aramwit *et al.*, 2010).

Para minimizar el impacto negativo de la luz sobre las antocianinas, se pueden usar envases hechos de materiales que bloqueen la luz del espectro visible y, especialmente, del campo ultravioleta del espectro, creando así una barrera protectora. Además, la glicosilación, la acilación y la co-pigmentación desempeñan un rol importante en el aumento de la estabilidad de las antocianinas a la luz (Remini *et al.*, 2018).

2.3.6. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico tiene una función relevante como antioxidante en el cuerpo humano (Sheraz *et al.*, 2015). Se encuentra en varias frutas y verduras, y, además, se agrega como antioxidante a varios tipos de alimentos para aumentar su valor nutricional. En el procesado de alimentos, cualquier cambio en el nivel de vitamina C muestra que la calidad del alimento se ha deteriorado después del procesado y durante el almacenamiento (Tewari *et al.*, 2017).

Sin embargo, la presencia de ácido ascórbico en un entorno con antocianinas provoca su degradación más rápida, con pérdida de color (Farr & Giusti, 2018; Sikorski, 2018). La presencia de oxígeno en el ambiente favorecerá esta degradación, formando el pigmento polimérico y la decoloración de las antocianinas. Los presuntos mecanismos de degradación son la condensación directa del ácido ascórbico con las antocianinas, o la formación de peróxido de hidrógeno y el clivaje oxidativo del anillo de pirilio por peróxidos (Levy *et al.*, 2019). La pérdida de antocianinas por esta escisión oxidativa se debe a su capacidad de actuar como un activador del oxígeno molecular, generando así radicales libres como resultado de esta reacción (Socaciu, 2008).

Por otro lado, se cree que las moléculas electrofílicas, como los bisulfitos, el peróxido de hidrógeno y el ácido ascórbico, tienen como objetivo los sitios nucleofílicos de las antocianinas. Se ha propuesto que el ácido ascórbico causa una degradación recíproca e

irreversible tanto del pigmento como de los micronutrientes. Este proceso es distinto a la decoloración con bisulfito, que es reversible y sensible al pH. Por lo tanto, este fenómeno es una barrera para el uso de las antocianinas como colorantes de alimentos, en particular de jugos y bebidas que suelen ser fortificados con vitamina C (Farr & Giusti, 2018).

El efecto del ácido ascórbico sobre las antocianinas es complejo y depende de varios factores, pero también de la matriz (He, 2008). Por ejemplo, en un ambiente con H_2O_2 , concentraciones entre 60–80 mg/L de ácido ascórbico favorecieron la estabilización de las antocianinas en el jugo de granadas, mientras que en el jugo de cerezas una concentración de 80 mg/L produjo una rápida degradación de las antocianinas (Ozkan, 2002). Por lo tanto, cuando los niveles de oxígeno y de ácido ascórbico son altos, el impacto de la degradación es más evidente. Los iones cobre aceleran los procesos (Remini *et al.*, 2018).

2.3.7. Sulfitos

El dióxido de azufre se ha utilizado para la conservación de alimentos desde el siglo XVIII, especialmente para alimentos con un pH bajo como el vino (Christofi *et al.*, 2020). El SO_2 se utiliza intensamente en la industria del vino, debido a sus propiedades antisépticas contra levaduras y bacterias y a sus propiedades antioxidantes, lo que lo convierte en uno de los aditivos más versátiles y eficientes (Pozo-Bayon *et al.*, 2012; Gabriele *et al.*, 2018). Puede atravesar la membrana celular de las bacterias, alterando la acción de las enzimas y proteínas celulares, y regulando así el desarrollo microbiano (Christofi *et al.*, 2020).

Estas propiedades del dióxido de azufre detienen fermentaciones no deseadas, como la fermentación maloláctica y acética, y limitan la actividad de las oxidasas que son endógenas en las uvas o pueden provenir de una infección fúngica. Además, el SO_2 provoca la decoloración de los pigmentos y elimina los olores desagradables de la oxidación (Gabriele *et al.*, 2018).

Los sulfitos y sulfatos suelen ser utilizados en el almacenamiento de alimentos derivados de frutas y verduras, como inhibidor del crecimiento microbiano y del pardeamiento enzimático y no enzimático (Remini *et al.*, 2018), pero pueden provocar la pérdida de antocianinas. Esta decoloración se produce por la formación de estructuras incoloras derivadas del azufre cuando estos compuestos de azufre se unen a las posiciones 2 o 4 de las antocianinas (**Figura 2.3**) (Cavalcanti *et al.*, 2011). Cuando se calientan las antocianinas se libera una cantidad de dióxido de azufre (SO_2), recuperándose parcialmente el color. La acidificación a pH bajo también regenera a las antocianinas mediante la liberación de SO_2 . Altas concentraciones de sulfito (más de 10 g/kg) desencadenan la degradación permanente de las antocianinas (Cavalcanti *et al.*, 2011).

El SO_2 actúa también como solvente durante la vinificación, permitiendo extraer los componentes sólidos de las uvas, como los tallos, las semillas y los hollejos. Se utiliza, además, en otras tres etapas de la vinificación: 1) Durante el proceso de pre-fermentación, en las uvas o mostos, para evitar la oxidación. Sin embargo, este fenómeno no ocurre por eliminación directa del oxígeno de los comestibles, sino por unión a los precursores involucrados en las reacciones oxidativas y compuestos resultantes de la oxidación (Pozo-Bayon *et al.*, 2012; Christofi *et al.*, 2020). 2) Una vez finalizada la fermentación y antes de

las fases de envejecimiento o almacenamiento, se utiliza para limitar el desarrollo microbiano que podría afectar a los vinos. 3) Poco antes del embotellado, los vinos se estabilizan con SO_2 para evitar cualquier cambio o accidente en las botellas (Pozo-Bayon *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el tratamiento con dióxido de azufre es de gran importancia en la tecnología del vino. Sin embargo, su uso está estrictamente controlado, porque altas dosis de SO_2 pueden causar cambios organolépticos del producto final (como sabores no deseados). Asimismo, la ingestión de este compuesto produce efectos negativos en la salud humana, como respuestas alérgicas (Pozo-Bayon *et al.*, 2012). Como resultado, el contenido máximo de SO_2 en los vinos autorizado por ley se ha reducido gradualmente a 150 y 200 mg/L para los vinos tintos y blancos respectivamente. En la actualidad se busca minimizar o eliminar el uso de SO_2 en la vinificación, mediante la investigación de tecnologías innovadoras (Christofi *et al.*, 2020).

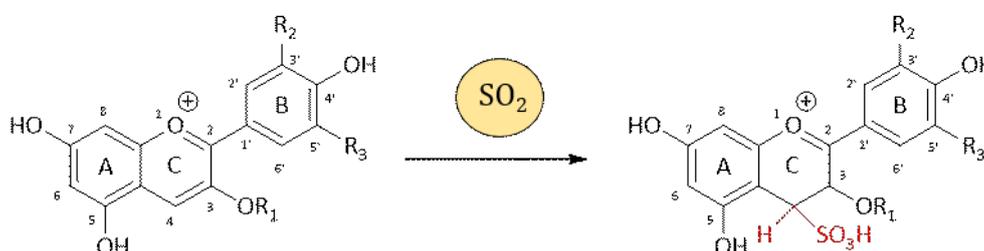


Figura 2.3. Reacción de las antocianinas con SO_2 .

2.3.8. *Enzimas*

Las enzimas más comunes que degradan a las antocianinas son las glicosidasas, peroxidadas (fenol-oxidadas) y fenolasas (polifenol-oxidadas) (Riaz *et al.*, 2016). El nombre colectivo de estas enzimas es *antocianinasas* (Sikorski, 2018). Estas enzimas pueden ser producidas por la planta y estar presentes en sus tejidos, o pueden provenir de la contaminación microbiana. Vale la pena señalar que las glicosidasas afectan directamente a las antocianinas, mientras que las peroxidadas y fenolasas tienen efectos indirectos sobre su estabilidad (Marszałek *et al.*, 2017).

Las glicosidasas rompen el enlace covalente entre la unidad de glicosilo y la aglicona de una antocianina, y así se forman antocianidinas inestables (Riaz *et al.*, 2016). Este proceso afecta además al color del compuesto (Marszałek *et al.*, 2017).

Las polifenol-oxidadas y las peroxidadas, que son enzimas específicas de las plantas, una vez removidas de los compartimentos celulares durante la extracción de las antocianinas, acelerarán su degradación (He, 2008). La polifenol-oxidada es la enzima que catalizará dos tipos de reacciones: *o*-hidroxilación de monofenoles en *o*-difenoles y oxidación de *o*-difenoles en *o*-quinonas.

Las antocianinas pueden sufrir un ataque nucleofílico por las quinonas en C-2 y C-4 cargados positivamente del anillo C y sumado a la oxidación se formarán productos de polimerización marrón negruzcos, denominados *melaninas*, a partir de las quinonas producidas por la enzima polifenol-oxidada. Esto ocurre en las aceitunas negras naturales

(Lúquez Bibiloni & Aguilera Radic, 2006). La polifenol-oxidasa reacciona directamente con las antocianinas, que son sustratos débiles de esta enzima, provocando su degradación mediante la co-oxidación de las *o*-quinonas generadas enzimáticamente y/o productos de oxidación secundaria de la quinona (Deylami *et al.*, 2016).

Se asume que la primera enzima que afecta la estabilidad de las antocianinas es la β -glucosidasa, la cual forma antocianidinas que pueden ser oxidadas posteriormente por la polifenol-oxidasa y/o peroxidasa (Marszałek *et al.*, 2017). Tras la acción de estas enzimas, la solubilidad de las antocianinas disminuye y se producen compuestos incoloros (Sikorski, 2018).

2.3.9. Efecto de la co-pigmentación

La co-pigmentación es un fenómeno específico de las antocianinas, que no se observa en otros polifenoles ni en compuestos no fenólicos (Kammerer, 2016). La co-pigmentación se caracteriza por la formación de asociaciones moleculares o complejos entre las antocianinas y otros compuestos orgánicos incoloros, o con iones metálicos, provocando un cambio o un incremento en la intensidad del color (Boulton, 2001). En la Ciencia de los Alimentos, este fenómeno es una interacción muy importante porque el color es uno de los principales factores de calidad en la aceptación de un producto (Eiro & Heinonen, 2002).

El principal mecanismo utilizado para estabilizar el color de las antocianinas es la co-pigmentación con otros compuestos (co-pigmentos), especialmente en las plantas (Mazza & Brouillard, 1990; Davies & Mazza, 1993). Los co-pigmentos son sistemas ricos en electrones π que son capaces de asociarse con iones flavilio, que son deficientes en electrones, produciendo así la estabilización. Además, esta asociación protege al ion flavilio del ataque nucleofílico del agua en la posición 2 (Matsufuji *et al.*, 2003; Trouillas *et al.*, 2016). También protege de otras especies como peróxidos y dióxido de azufre en la posición 4 (Mazza & Brouillard, 1987; García-Viguera & Bridle, 1999).

Para que una molécula actúe como un co-pigmento, debe cumplir dos requisitos: 1) Poseer sistemas π -conjugados suficientemente extendidos, que se supone que favorecen la interacción π - π o formación de complejos π . 2) Tener grupos donantes/aceptores de puentes de hidrógeno, como los grupos OH y C=O (Trouillas *et al.*, 2016). Así, la solución de antocianinas con el co-pigmento tendrá un color mucho más intenso de lo que teóricamente se esperaría al valor de pH del medio (Escribano-Bailon *et al.*, 2012). Cabe mencionar que la magnitud del efecto de co-pigmentación depende del pH, ya que a valores bajos de pH, todas las antocianinas están en forma de ion flavilio, y a valores altos de pH, las antocianinas están en su forma de pseudobase carbinólica, que es incolora y un aumento adicional del pH provocará la destrucción de las antocianinas y, por tanto, una disminución de la intensidad del color de la solución (Jamei & Babaloo, 2017).

Al mismo tiempo, la estabilidad de los complejos co-pigmentados se ve influenciada por la degradación térmica. Por lo tanto, a altas temperaturas el mecanismo de co-pigmentación no tiene efectos visibles o incluso puede conducir a resultados opuestos. Por ejemplo, la co-pigmentación con ácido ferúlico, ácido sinápico o tratamiento térmico a 90°C durante 12 horas, o bien, a 88°C durante 2 minutos dio como resultado una degradación

acelerada de las antocianinas (Tan *et al.*, 2021). Además, la interacción entre las antocianinas y los co-pigmentos es diferente dependiendo de su naturaleza y concentración, brindando así diferentes tonos e intensidades de color (Escribano-Bailon *et al.*, 2012).

Los co-pigmentos son generalmente incoloros en forma libre, pero cuando se mezclan con una solución de antocianinas hay una interacción, que produce un efecto hiperacrómico y un desplazamiento batocrómico en los espectros de absorción (región UV-Vis), ya que las antocianinas libres absorben luz a una cierta longitud de onda, y después de la co-pigmentación este valor aumenta significativamente. Como tal, el complejo de antocianina-co-pigmento tendrá una longitud de onda de absorción más larga (Andersen & Jordheim, 2010; Molaefard *et al.*, 2020). La naturaleza de estos compuestos puede ser muy variada, por lo tanto, los co-pigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, polisacáridos, metales o incluso otras antocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2021). La eficiencia del efecto de co-pigmentación depende de la disposición estérica de la sustancia (el mejor efecto de co-pigmentación ocurre en el caso de una estructura plana) y su tamaño, con el fin de lograr la estabilización del ion flavilio (Escribano-Bailon *et al.*, 2012).

La interacción entre antocianinas y co-pigmentos se puede lograr de cuatro formas diferentes, dependiendo de la naturaleza del co-pigmento (**Figura 2.4**).

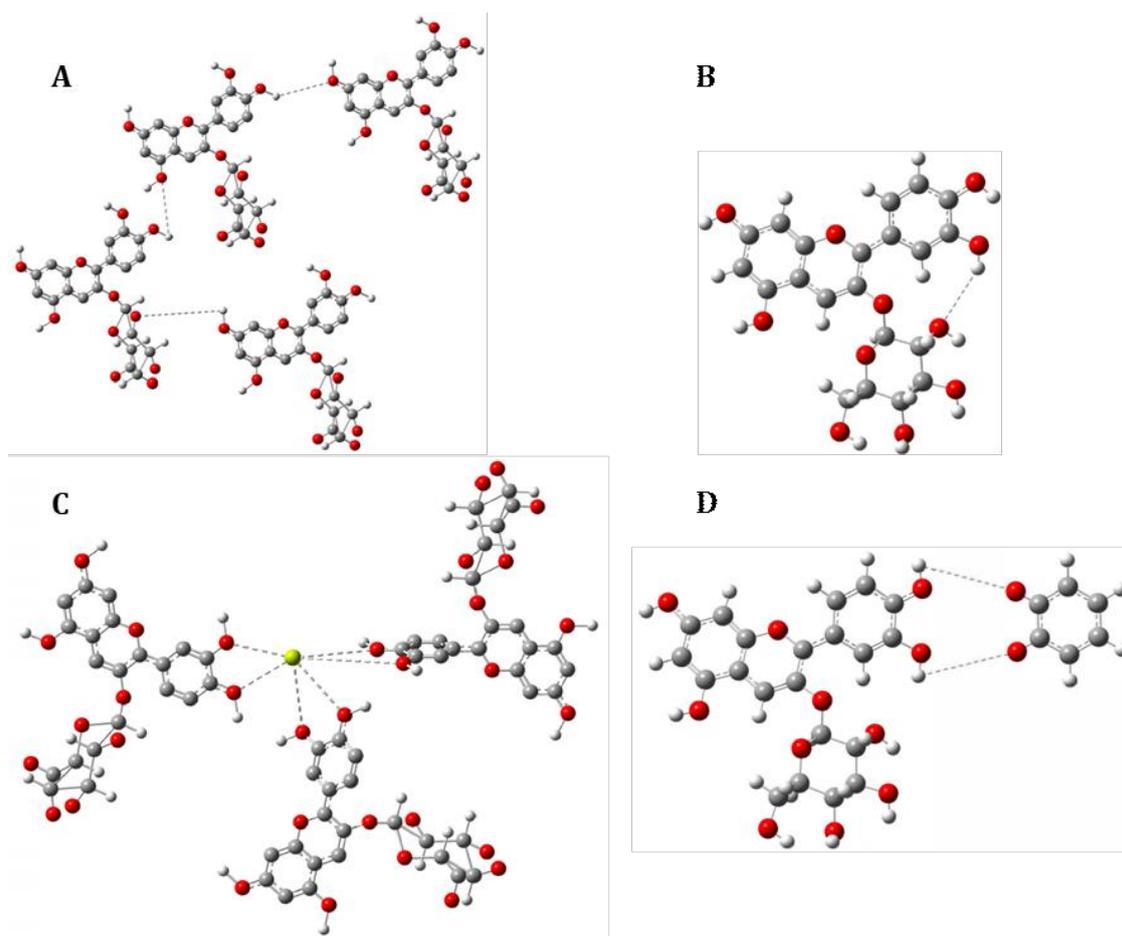


Figura 2.4. Interacción de las antocianinas. (A) Auto-asociación, (B) co-pigmentación intramolecular, (C) complejación con metales, (D) co-pigmentación intermolecular (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Si el co-pigmento es otra antocianina existe una interacción entre las partes cromóforas y no cromofóricas de la misma molécula y se forma una **autoasociación** (Figura 2.4 A) (Fernandes *et al.*, 2015) o una **co-pigmentación intramolecular** (Figura 2.4 B); cuando la interacción es con un metal, se produce una **complejación** (Figura 2.4 C); en el caso de co-pigmentos incoloros con pares de electrones libres, se lleva a cabo una **co-pigmentación intermolecular** (Figura 2.4 D). Finalmente, existen casos más complejos de co-pigmentación cuando las antocianinas forman compuestos al mismo tiempo con varias moléculas como agliconas, azúcares, co-pigmentos y protones.

Cuando el co-pigmento de la antocianina es otro compuesto fenólico; esta interacción es transitoria debido a la falta de enlaces químicos. En realidad, se forman complejos de transferencia de carga o interacciones π - π (entre orbitales p - p) (Foster, 1969). Este fenómeno se produce cuando los compuestos interactuantes tienen cargas opuestas y así, la densidad electrónica se transfiere del anillo rico (sustrato rico en electrones), al pobre en electrones (ión flavilio con carga positiva) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Trouillas *et al.*, 2016).

La co-pigmentación total resultante se basa en dos efectos (Dangles & Brouillard, 1992): 1) La formación del complejo π - π que provoca cambios en las propiedades espectroscópicas en el ion flavilio, el efecto hiperocrómico y el desplazamiento batocrómico, como hemos mencionado; y 2) El aumento del color rojo por la estabilización del ión flavilio por el complejo π (Figura 2.5).

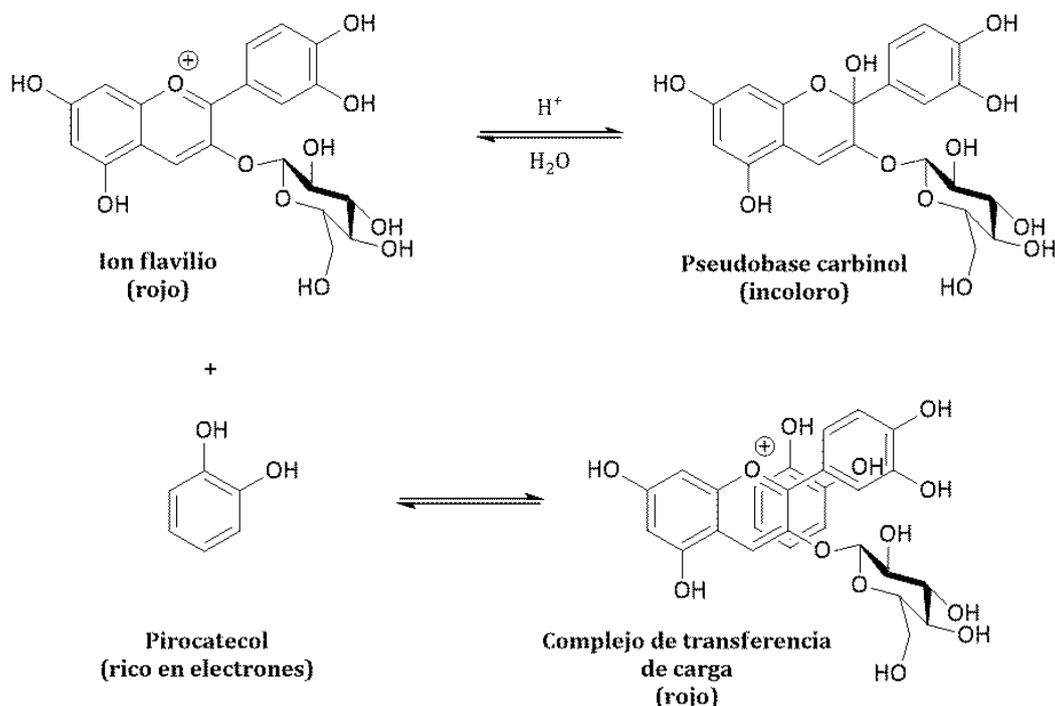


Figura 2.5. Ejemplo de estabilización de antocianinas mediante la formación del complejo por transferencia de carga (interacción de la antocianina con un compuesto fenólico) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que la formación del complejo π - π induce las reacciones entre antocianinas y taninos en los vinos, produciendo enlaces covalentes que generan taninos pigmentados (Mirabel *et al.*, 1999). El acoplamiento químico entre antocianinas y taninos

no es bien conocido; sin embargo, hace tiempo se ha sugerido que el mecanismo involucra acetaldehído, taninos y antocianinas (Timberlake & Bridle, 1976); También se han observado reacciones similares entre taninos y flavan-3-oles (Saucier *et al.*, 1997; Salas *et al.*, 2004).

2.3.9.1. Co-pigmentación por Auto-asociación

Como hemos visto, las antocianinas pueden formar enlaces con otras antocianinas, denominándose a este tipo de interacción *auto-asociación* (**Figura 2.4 A**) El complejo obtenido no presenta un grado de asociación tan fuerte como en los complejos π , pues es necesaria una mayor concentración de antocianinas para que se produzca este fenómeno. Sin embargo, existen algunas interacciones de auto-asociación más fuertes que otras en el caso de especies neutras, pero pueden desestabilizarse debido al rechazo de los cationes flavilio entre sí por la carga positiva, y también, de las bases aniónicas entre sí por la carga negativa (Houghton *et al.*, 2021).

Además, se ha demostrado recientemente que las moléculas de antocianinas se disponen verticalmente en agregados quirales (helicoidales), con geometría izquierda. La estructura se fortalece por los puentes de hidrógeno entre los azúcares unidos a las antocianinas; la posición y el tamaño de los azúcares son responsables de la alineación general del complejo (Escribano-Bailon *et al.*, 2012; Houghton *et al.*, 2021). Este proceso ocurre durante el envejecimiento del vino y desempeña un papel en el color de los vinos tintos añejos. El mecanismo responsable de este proceso requiere mayor investigación.

2.3.9.2. Co-pigmentación intra- e intermolecular

Las *interacciones intramoleculares* se realizan por interacción π - π entre la unidad acilo hidrofóbica unida covalentemente al azúcar y el anillo C de flavilio (**Figura 2.5**), disminuyendo así la hidrólisis de las antocianinas (Mateus & de Freitas, 2008), y las *interacciones intermoleculares* ocurren debido a las fuerzas de van der Waals entre el núcleo polarizable plano de la antocianina y el co-pigmento incoloro (**Figura 2.6**) (Rodríguez-Amaya, 2019). La co-pigmentación intermolecular ocurre con frecuencia en los vinos tintos, debido a las interacciones de van der Waals ya mencionadas, pero también por los efectos hidrofóbicos y los puentes de hidrógeno, que logran una interacción no covalente entre las moléculas de antocianina y otras moléculas (co-pigmentos).

Estas interacciones confieren a los vinos más tonalidades de púrpura y un color más oscuro, debidos al efecto hiperacrómico y al batocrómico. Este cambio de color es el resultado de cambiar la conformación del cromatóforo antocianina, pero también por evitar la reacción de hidratación, determinando así un aumento en la proporción entre el catión flavilio (color rojo) y la base quinoidal (color púrpura) (Zhao *et al.*, 2020). Esta interacción juega un rol importante en la prevención de la decoloración durante los tratamientos de luz y calor (Malien-Aubert *et al.*, 2001).

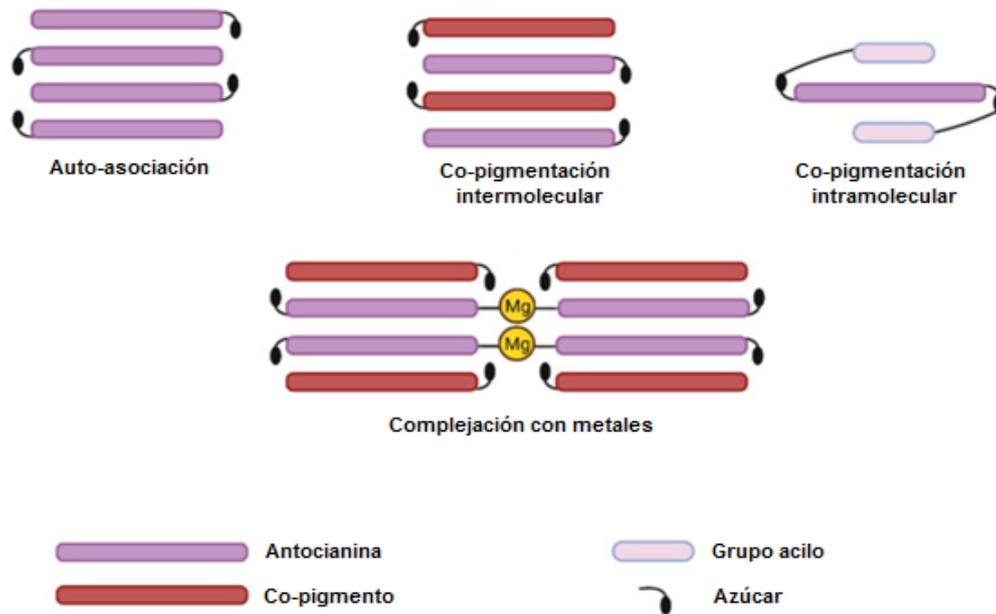


Figura 2.6. Tipos de co-pigmentación de antocianinas.

Por último, la co-pigmentación intermolecular tiene lugar tanto en fluidos vacuolares, como extravacuolares. Es el principal mecanismo responsable de la multitud de colores que aparecen en las flores, considerando el número limitado de antocianinas existentes (Escribano-Bailon *et al.*, 2012).

Por otro lado, la co-pigmentación intramolecular ocurre debido a la alineación de los fragmentos acilo aromáticos de las antocianinas aciladas y la estructura de la antocianidina. Además, el azúcar de la estructura de la antocianina actúa como un espaciador entre el esqueleto de la antocianina y la unidad acilo, permitiendo así que la molécula se pliegue de manera que el grupo acilo aromático interactúe con el sistema π del anillo de pirilio planar protegiéndolo contra el ataque nucleofílico del agua (Escribano-Bailon *et al.*, 2012; Kammerer, 2016). Debido a la formación de estructuras tipo sándwich (la antocianina se incorporará entre dos unidades acilo), se logrará una estabilización eficiente de las antocianinas para aquellas que tengan dos o más unidades aromáticas acilo necesarias para obtener este complejo (Kammerer, 2016).

Las interacciones intramoleculares no sólo ocurre en las flores, sino también en otras plantas comestibles como las zanahorias negras, que tienen un alto contenido de antocianinas aciladas, lo cual estabiliza su color aún a pHs neutros (Rein, 2005). La co-pigmentación intramolecular es más eficiente y fuerte que la co-pigmentación intermolecular en la estabilización del color de las antocianinas (Rein, 2005). Se ha demostrado que todos los tipos de reacciones de co-pigmentación tienen un efecto beneficioso en la mejora de la estabilidad de las antocianinas (Molaeafard *et al.*, 2020).

2.3.9.3. Co-pigmentación por interacción con iones metálicos

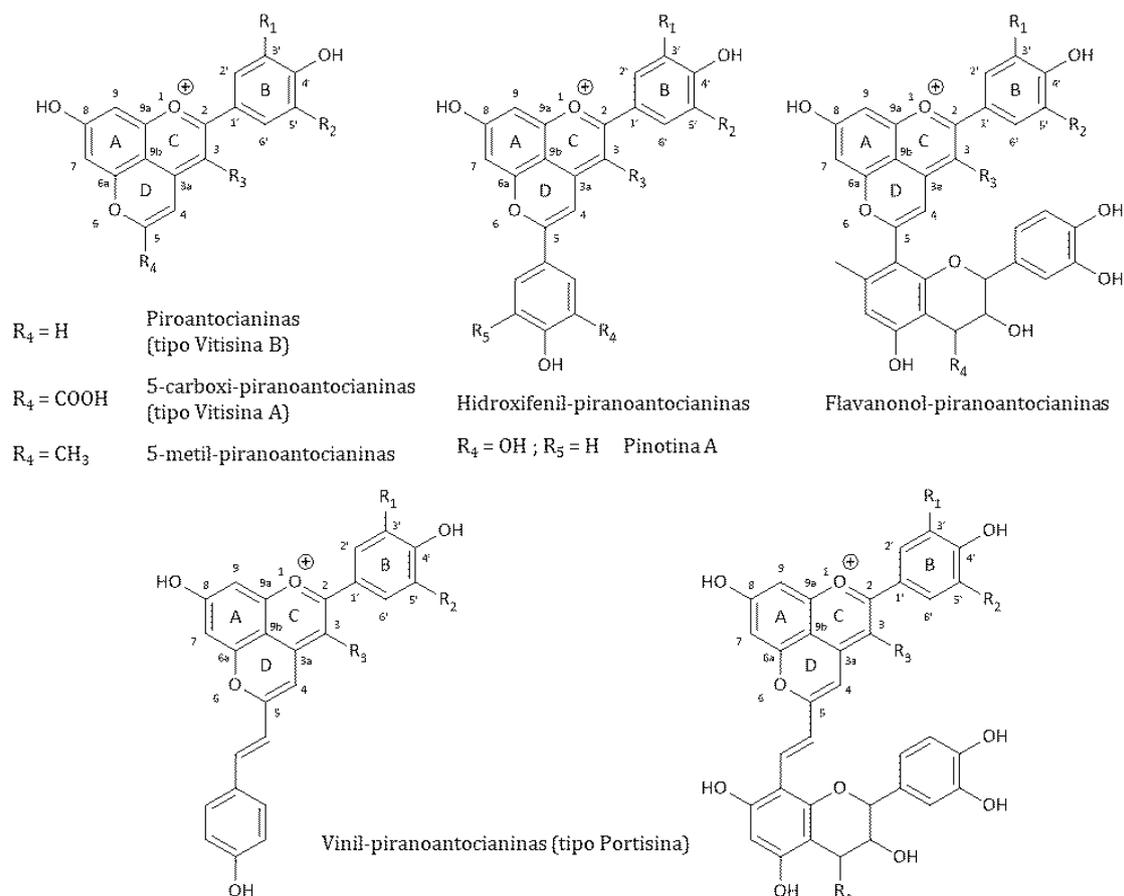
La variedad de color en las flores se explicó inicialmente por la formación de quelatos entre metales y sales de flavilio (Clifford, 2000, Andersen & Jordheim, 2010). A pesar del bajo interés en la industria alimentaria sobre la complejación antocianina-metal, esta interacción es una alternativa exitosa para estabilizar el color, siempre y cuando los metales utilizados no representen un riesgo para la salud humana y sean minerales esenciales en una dieta balanceada (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). En este tipo de co-pigmentación, el catión metálico tiene la capacidad de modificar el espectro de absorción del anillo de pirilio al afectar la distribución de electrones no localizados. Los efectos de color más fuertes se pueden observar cuando la co-pigmentación se realiza con metales alcalinotérreos cargados positivamente o con metales (+2, +3) (Morata *et al.*, 2019).

Una de las principales características de las antocianinas y antocianidinas con grupos *o*-di-OH en el anillo B (cianidina, delfinidina, petunidina), es su capacidad de formar complejos metal-antocianina (Boulton, 2001). Los metales más comunes que pueden formar complejos con las antocianinas son el cobre (Cu), el hierro (Fe), el magnesio (Mg), el estaño (Sn) y el potasio (K) (Rein, 2005; Trouillas *et al.*, 2016). Algunos estudios sugieren que el color azul de las plantas se debe a la formación de complejos entre antocianinas y algunos metales como Al, Fe, Cu y Sn (Starr y Francis, 1973) o Mg y Mo (Hale *et al.*, 2001). En la interacción Al(III)-antocianina, la formación de complejos se llevó a cabo con cianidina y otros flavonoides, lo cual estabiliza la base quinoidal azul evitando su oxidación (Moncada *et al.*, 2003). Se considera que la formación de complejos antocianina-molibdeno [Mo (IV y VI)] es responsable de la estabilización del color azul en el tejido del repollo hindú (Hale *et al.*, 2001; Riaz *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la formación de complejos entre antocianinas *o*-dihidroxiladas y iones Fe (III) o Mg (II) a pH 5 es esencial para la formación del color azul en las plantas, lo cual es posible si la relación estequiométrica antocianina : Fe (III) es de 1:6, o superior para Mg (II) (Yoshida *et al.*, 2006; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Cortez *et al.*, 2017).

Finalmente, este proceso puede reducir la concentración de iones libres en la célula, minimizando así la toxicidad de los metales en las plantas. Los metales tóxicos que forman complejos con las antocianinas quedarán secuestrados en las vacuolas, por lo que los iones de estos metales se acumulan en tejidos no fotosintéticos, que son menos sensibles y, por tanto, no se verán afectados procesos importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas propiedades de las antocianinas tienen implicancias biotecnológicas importantes ya que las plantas que tienen una gran cantidad de antocianinas pueden usarse para fitorremediar suelos contaminados con metales tóxicos (Landi *et al.*, 2015).

2.3.10. Piranoantocianinas

En 1996 se detectó una nueva clase de pigmentos, las piranoantocianinas, en filtrados de vinos tintos y también en soluciones modelo de vino (Cameira-dos Santos *et al.*, 1996) (**Figura 2.7**). Es probable que contribuyan al color de los vinos tintos añejos. Durante los últimos quince años, estos compuestos han recibido cada vez más atención porque son más estables que las antocianinas, a distintos valores de pH.



En todos los casos: $R_3 =$ glucosa o su forma acetilada

Figura 2.7. Estructuras químicas de las principales piranoantocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

2.4. Conclusiones del Capítulo 2

En este Capítulo se realizó una revisión exhaustiva sobre las antocianinas, abarcando desde su biodisponibilidad, hasta las características estructurales y factores que afectan su estabilidad y su relevancia funcional en sistemas biológicos y aplicaciones tecnológicas. Estas moléculas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, se destacan no sólo por su amplia distribución en el reino vegetal, sino también por su capacidad de actuar como pigmentos naturales y compuestos bioactivos de interés en la alimentación, la medicina y la cosmética.

Se resaltó la importancia de las antocianinas como compuestos bioactivos, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas. Estos beneficios no sólo las convierten en agentes terapéuticos prometedores, sino que también respaldan su uso en el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos nutricionales.

Se exploraron las complejas interacciones intramoleculares e intermoleculares que afectan sus propiedades fisicoquímicas, como el color y la estabilidad, incluyendo fenómenos como la co-pigmentación y la formación de complejos con metales.

Un aspecto crítico abordado es la estabilidad de las antocianinas, analizando los factores ambientales y químicos que contribuyen a su degradación, como el pH, la temperatura, la luz, el oxígeno, los sulfitos y el ácido ascórbico. También se destacaron las estrategias para preservar su estabilidad y aumentar su biodisponibilidad, entre ellas la acilación y el uso de co-pigmentos, métodos que resultan esenciales para su aplicación en contextos industriales y alimentarios.

Este análisis establece un vínculo directo con el capítulo siguiente, que explorará en detalle las actividades biológicas de las antocianinas, con énfasis en su capacidad antioxidante y su papel protector frente al estrés oxidativo y condiciones patológicas asociadas.

Capítulo 3. Antocianinas y su relación con la actividad antioxidante

3.1. Actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*) son compuestos de gran importancia para el sistema inmunológico con un rol en la señalización celular y otras funciones corporales. No obstante, la producción de grandes cantidades de estos compuestos, que el cuerpo ya no puede eliminar con la ayuda de antioxidantes endógenos y exógenos, provocará la alteración del equilibrio oxidativo del sistema biológico y la aparición de estrés oxidativo (Smeriglio *et al.*, 2016; Brainina *et al.*, 2019; Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Ocurren entonces cambios oxidativos en las moléculas, daño tisular y provoca muerte celular acelerada, todo lo cual altera la función celular, que es el primer paso en la aparición de muchas enfermedades (Gulcin, 2020).

Los compuestos que son más fáciles de oxidar son los mejores antioxidantes (inhiben la oxidación de otras moléculas, donando un electrón o átomo de hidrógeno a los radicales libres reactivos para neutralizarlos) Es decir, un compuesto antioxidante es un agente reductor (se oxida y reduce a los demás).

La definición química de un compuesto antioxidante es “que, cuando está presente en concentraciones bajas, en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasará o inhibirá significativamente la oxidación de ese sustrato” (Halliwell & Gutteridge, 2015). Esta definición, que describe una acción directa de un antioxidante, es perfecta para un tubo de ensayo, pero resulta insuficiente para un cultivo que contenga células vivas o para un organismo vegetal, animal o humano. En estos casos más complejos, un antioxidante se considera como “una sustancia que protege a las células del daño causado por los radicales libres” (National Cancer Institute Dictionary of Cancer Terms, 2024) y otras ROS/RNS.

La propiedad básica de un antioxidante es que ayuda a limitar el daño oxidativo en el cuerpo humano al prevenir o detectar una cadena de propagación oxidativa mediante la estabilización del radical producido.

Los principales *antioxidantes endógenos* son enzimas, como: superóxido-dismutasa, glutatión-peroxidasa y catalasa, pero ciertos compuestos no enzimáticos también pueden tener funciones antioxidantes, como la bilirrubina, la albúmina, la metalotioneína y el ácido úrico. En algunos casos, los agentes endógenos no logran proporcionar una protección efectiva y un control estricto contra las especies reactivas de oxígeno, por lo que existe la necesidad de administrar antioxidantes exógenos en forma de suplementos nutricionales o compuestos farmacéuticos con antioxidantes. Los *antioxidantes exógenos* más importantes son las vitaminas C y E, β -caroteno, ciertos elementos como selenio (Se) y entre los compuestos antioxidantes de origen vegetal: los compuestos fenólicos (flavonoides), los compuestos nitrogenados (derivados de la clorofila), los tocoferoles, los carotenoides y el ácido ascórbico (Nichenametla *et al.*, 2006; Pisoschi & Negulescu, 2011).

Dos propiedades son responsables de la actividad antirradicalaria efectiva de un compuesto: a) alta reactividad con los radicales libres y b) alta estabilidad de su radical formado en estas reacciones, evitando su participación en procesos en cadena. Para los flavonoides, se propusieron las siguientes características estructurales, denominadas "criterios de Bors", para condicionar la función antioxidante óptima: 1) la presencia de un

grupo catecol en el anillo B que, debido al puente de hidrógeno, conduce a una alta estabilidad del radical flavonoide formado, 2) un doble enlace 2,3 junto con un grupo C-4-oxo en el anillo C, que facilita la deslocalización de electrones, y 3) la presencia de HO-3 y HO-5 junto con el grupo C-4-oxo que permite la deslocalización de electrones a través de puentes de hidrógeno (Bors *et al.*, 1990 a,b).

3.2. Ensayos de medición de actividad antioxidante

La medición de la actividad antioxidante de muestras biológicas y de alimentos es de crucial importancia, no sólo para asegurar la calidad de los alimentos sino también para determinar la efectividad de los antioxidantes de los alimentos funcionales en la prevención y el tratamiento de enfermedades basadas en estrés oxidativo (Munteanu & Apetrei, 2021).

Se han desarrollado varios ensayos antioxidantes para evaluar la capacidad de las antocianinas para inhibir el proceso de oxidación que ocurre de forma natural (Gulcin, 2020; Tena *et al.*, 2020). Los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante deben tener ciertas características como rapidez y reproducibilidad y pueden realizarse con pequeñas cantidades de los compuestos analizados (Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

Las sustancias con capacidad antioxidante, como las antocianinas, pueden actuar a través de múltiples mecanismos como: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, *hydrogen atom transfer*), transferencia de un solo electrón (SET, *single electron transfer*) o la capacidad de quelar metales de transición (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). En el mecanismo HAT, un radical libre $R\cdot$ remueve un átomo de hidrógeno del antioxidante y se convierte en un producto más estable, al formarse un radical libre del antioxidante: $A\cdot$. En el mecanismo SET, el antioxidante dona un electrón al radical libre, formando también $A\cdot$. Estos dos mecanismos suelen operar simultáneamente, y su contribución está determinada por la estructura del antioxidante, la solubilidad, los coeficientes de partición de los reactantes y la polaridad del solvente (Tena *et al.*, 2020). Los métodos basados en ambos mecanismos o su combinación se muestran en la **Tabla 3.1**.

Existen, además, otro tipo de ensayos que no se basan en los mecanismos antes mencionados y que miden la capacidad de la muestra de atrapar oxidantes que interactúan y producen un efecto negativo sobre las principales macromoléculas de los sistemas biológicos (Vitale *et al.*, 2016). Una de estas pruebas es el ensayo de atrapar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (*hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging assay*) (Gulcin, 2020).

Además de los ensayos mencionados basados en reacciones con sustratos no fisiológicos, que permiten sólo una evaluación general de la capacidad antioxidante, de relevancia fisiológica limitada, se demostró que las antocianinas reaccionan con radicales peróxido y otras especies reactivas de oxígeno como aniones radicales superóxido (Yamasaki *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 2006), óxido nítrico (Nikkhah *et al.*, 2009), peróxido de hidrógeno (Bi *et al.*, 2014; Satake & Yanase, 2018; Bartosz *et al.*, 2020) y peroxinitrito (Tsuda *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2006; Bartosz *et al.*, 2020).

Tabla 3.1. Clasificación de los ensayos *in vitro* según su modo de reacción SET o HAT.

ENSAYO	CATEGORÍA
DECOLORACIÓN DEL RADICAL CATION DEL ÁCIDO 2,2'-AZINO-BIS(3-ETILBENZO-TIAZOLIN)-6-SULFÓNICO (ABTS ^{•+}) (RE ET AL., 1999; BAO ET AL., 2018) *	ENSAYOS BASADOS EN LA TRANSFERENCIA DE UN SOLO ELECTRÓN (SET)
DECOLORACIÓN DEL RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILHIDRAZILO (DPPH [•]) (KOCA & KARADENIZ, 2009; SHARMA & BHAT, 2009) *	
POTENCIAL ANTIOXIDANTE POR REDUCCIÓN DE IONES FÉRRICOS (FRAP, <i>FERRIC REDUCING ACTIVITY/ANTIOXIDANT POWER ASSAY</i>) (BENZIE & STRAIN, 1996; EINBOND ET AL., 2004)	
ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTAS Y VERDURAS CON <i>N,N</i> -DIMETIL- <i>P</i> -FENILENDIAMINA (DMPD)	
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR REDUCCIÓN DE IONES CÚPRICOS (Cu ²⁺) (CUPRAC, <i>CUPRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT CAPACITY</i>) (APAK ET AL., 2007)	
CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES OXÍGENO (ORAC, <i>OXYGEN RADICAL ABSORBING CAPACITY</i>) (CAO ET AL., 1993; WANG ET AL., 1997; OU ET AL., 2001; ZHENG Y WANG, 2003)	ENSAYOS BASADOS EN LA TRANSFERENCIA DE ÁTOMOS DE HIDRÓGENO (HAT)
PODER ANTIOXIDANTE DE CAPTURA TOTAL DE RADICALES (TRAP, <i>TOTAL RADICAL TRAPPING POWER</i>)	
INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO	
INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA HUMANA DE BAJA DENSIDAD (LDL, <i>LOW-DENSITY LIPOPROTEIN</i>) Y DE LA OXIDACIÓN DE LIPOSOMAS (HEINONEN ET AL., 1998)	

*Estos ensayos pueden involucrar reacciones SET y HAT (Dudonné *et al.*, 2009).

3.3. Actividad antioxidante de las antocianinas

Dentro de los flavonoides, los antioxidantes más relevantes son las antocianinas. Las antocianidinas y antocianinas han mostrado una actividad antioxidante mayor que las vitaminas C y E (Bagchi *et al.*, 1998). El contenido de antocianinas y su correspondiente actividad antioxidante contribuyen al efecto de las frutas y verduras contra enfermedades causadas por estrés oxidativo, las enfermedades degenerativas y crónicas (Heinonen *et al.*, 1998; Record *et al.*, 2001; Gulcin, 2020). Algunas plantas y extractos de frutas con alto contenido de compuestos fenólicos actúan como inhibidores de la mutagénesis y la carcinogénesis (Macheix *et al.*, 1990; Kumpulainen & Salonen, 1998). Hay una correlación lineal entre los valores de la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas en moras, frambuesas rojas, frambuesas negras y frutillas; además, los extractos de bayas poseen una alta actividad atrapante de especies reactivas de oxígeno generadas químicamente (Heinonen *et al.*, 1998; Wang & Lin, 2000). Las antocianinas son capaces de atrapar radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno fenólico (Chen *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996); ésta es la razón de su actividad anticarcinogénica (Kamei *et al.*, 1995). Sin embargo, otros compuestos fitoquímicos y vitaminas presentes en estos alimentos pueden interactuar con las antocianinas de manera sinérgica o antagónica, mejorando o disminuyendo su actividad antioxidante (Smeriglio *et al.*, 2016).

El comportamiento de una variedad de flavonoides en el ensayo de decoloración DPPH' depende de los criterios de Bors (Platzer *et al.*, 2021 a), pero su reactividad en varios ensayos antioxidantes es sólo parcialmente concordante con las predicciones de los criterios de Bors (Platzer *et al.*, 2021a,b, 2022). La aplicación de los criterios de Bors a las antocianinas es limitada ya que carecen del grupo C-4-oxo; Sin embargo, algunas de las predicciones de Bors parecen válidas.

La mayoría de las propiedades funcionales de las antocianinas, como su calidad sensorial y capacidad antioxidante están determinadas por su estructura química de sal de flavilio. Su estructura y propiedades, incluida su capacidad antioxidante, están influenciadas por ciertos factores, como: la temperatura, el pH y los solventes, que deben ser controlados para lograr eficiencia en esa bioactividad (Tena *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha discutido la actividad antioxidante de las antocianinas en sistemas libres de células, se han ejemplificado sus efectos antioxidantes sobre las células *in vitro*, en experimentos con animales y en ensayos en humanos (**Figura 3.1**), y se han analizado los campos de incertidumbre asociados con estos estudios (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024).

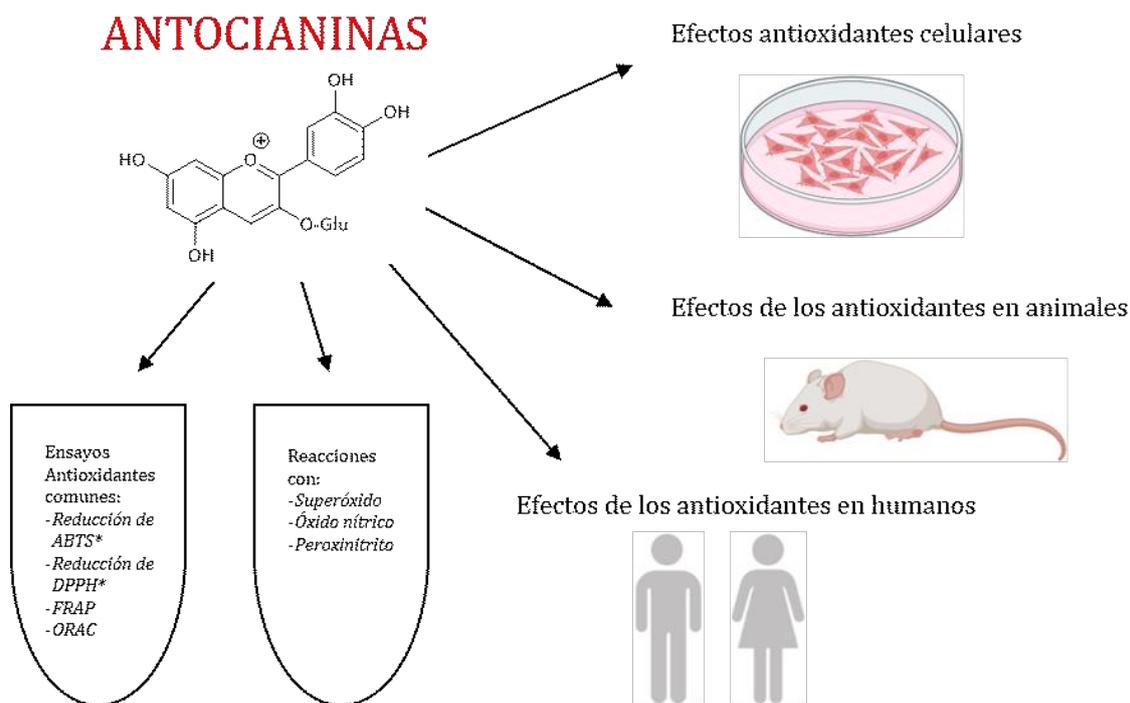


Figura 3.1. Análisis de la actividad antioxidante de las antocianinas (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024).

La actividad antioxidante de las antocianinas depende, en primer lugar, de sus agliconas. En las reacciones con oxidantes, las antocianidinas se transforman en radicales aroxilo, que son comparativamente más estables debido a la resonancia, que el radical libre que han reducido. El resultado puede ser la terminación de las dañinas reacciones oxidativas en cadena (Nimse & Pal, 2015).

La actividad antioxidante y antirradicalaria de las antocianidinas y las antocianinas está fuertemente relacionada con sus características estructurales, como: el tipo, número y

posición de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo, como grupos donantes de electrones (Ali *et al.*, 2016). Dos grupos estructurales son determinantes importantes de la actividad atrapante de radicales de las antocianidinas: 1) La estructura *orto*-dihidroxilo (catecol) en el anillo B. 2) Los dobles enlaces conjugados O1=C2 y C3=C4.

En las antocianidinas con estructura de catecol (1,2-difenol) o pirogalol (1,2,3-trifenol), la oxidación se lleva a cabo mediante radicales libres hasta formar una semiquinona muy estable. Estas antocianidinas son especialmente fáciles de oxidar porque el radical fenoxilo es bastante estable y no “extrae” fácilmente hidrógeno de otras sustancias, durando el tiempo suficiente para reaccionar con otra semiquinona y originar una reacción de desprotonación que genera una quinona y reconstituye un fenol a partir de los dos radicales interactuantes (Waterhouse, 2001).

Las antocianidinas con estructura de pirogalol (delfinidina) o una sustitución *o*-dihidroxilo (cianidina y petunidina) son las más activas como antioxidantes y, por lo tanto, más susceptibles a la oxidación, de acuerdo con la condición 1 de Bors. En el caso de pelargonidina, peonidina y malvidina, que no poseen *o*-dihidroxilo, la oxidación es más difícil.

De las seis antocianidinas más comunes, se espera que pelargonidina tenga la actividad antioxidante más baja y, por lo tanto, sea la más estable en condiciones de pH neutro (Fleschhut *et al.*, 2006). La estabilidad de los radicales de semiquinona aumenta por la extensión de la deslocalización radical sobre los anillos B y C de la antocianidina y los dos átomos de oxígeno de los hidroxilos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2010). Los radicales resultantes también se pueden estabilizar mediante puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo vecinos (Pereira *et al.*, 1996; Foti *et al.*, 2002). Considerando la estabilización del radical semiquinona en el catecol (Waterhouse, 2001), en la **Figura 3.2** se propone un mecanismo de radicales libres para la estabilización de la semiquinona formada a partir de la oxidación de cianidina. Es probable que el complejo de las antocianidinas *o*-dihidroxiladas con metales disminuya la capacidad antioxidante de la antocianina o antocianidina, porque los átomos de oxígeno están ligados al ion metálico, como en el complejo aluminio(III)-antocianina (Moncada *et al.*, 2003) y ya no estarían disponibles para reacciones de oxidación.

En resumen, la conjugación, así como los sustituyentes en C-3, C-5, C-7, C-3' y C-4' en los respectivos anillos C, A y B, son esenciales para la formación de diferentes estructuras electrónicas deslocalizadas y oxidadas (Kähkönen & Heinonen, 2003; Mattioli *et al.*, 2020).

La glicosilación de las antocianidinas disminuye la actividad antioxidante y la capacidad de atrapar radicales libres, en comparación con la aglicona, probablemente por el efecto estérico de las unidades de azúcar, disminuyendo así el poder de los radicales de antocianinas de deslocalizar electrones (Smeriglio *et al.*, 2016), pero también puede aumentar la actividad antioxidante de los *O*-glicósidos, dependiendo del tipo de antocianidina y azúcar, y el oxidante en cuestión (Wang *et al.*, 1997; Kähkönen & Heinonen, 2003). Por otro lado, la biodisponibilidad de la antocianina influye en la eficacia de la actividad antioxidante en el estrés oxidativo (Tena *et al.*, 2020).

El sitio de unión y el número de residuos glicosilo pueden afectar la capacidad antioxidante de las antocianinas (Zhao *et al.*, 2017). Por ejemplo, la 3-*O*-glicosilación puede

aumentar (peonidina y pelargonidina), no afectar (malvidina y cianidina) o disminuir (delfinidina y petunidina) la actividad antioxidante. El tipo de azúcar presentó diferentes efectos en la actividad de la antocianina: mientras que no se observó una diferencia significativa en la actividad de cianidina-3-*O*-glicósido con glucosa o galactosa, cianidina-3-*O*-arabinósido mostró una actividad significativamente menor (Kähkönen & Heinonen, 2003). Se encontró que oenina tenía una actividad antioxidante menor que malvidina en el ensayo de ABTS^{•+} (Rice-Evans *et al.*, 1996). Los 3-*O*-glicósidos de peonidina y petunidina fueron algo más efectivos en el ensayo de DPPH[•] que las antocianidinas correspondientes, pero delfinidina-3-*O*-glicósido (mirtilina) mostró una actividad menor que delfinidina en este test. En la protección contra la peroxidación lipídica inducida por 2,2-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), los 3-*O*-glicósidos de peonidina, petunidina y delfinidina fueron ligeramente más efectivos que las antocianidinas correspondientes (Dudek *et al.*, 2022).

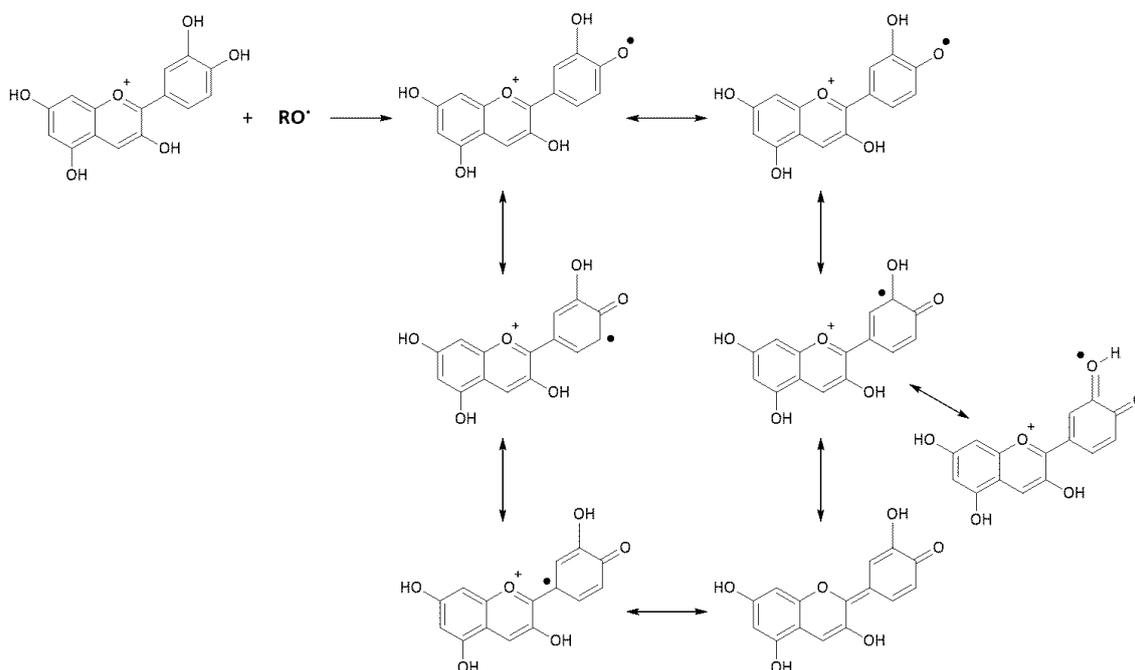


Figura 3.2. Mecanismo propuesto para la estabilización del radical semiquinona de cianidina (resonancia) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

La actividad antioxidante de las antocianinas está representada por la oxidación de los grupos hidroxilo fenólicos, más precisamente los grupos *para*- y *orto*-fenólicos, que tienen una función crucial en la formación de semiquinonas y en la estabilización de los productos de oxidación de un electrón (Mattioli *et al.*, 2020).

La mayor actividad de los 3-*O*-glicósidos de antocianidinas que sus agliconas podría deberse al efecto donante de electrones del azúcar unido a HO-3 (Jing *et al.*, 2014). Por otro lado, la diglicosilación de las antocianidinas en HO-3 y HO-5 disminuyó la actividad antioxidante (Kähkönen & Heinonen, 2003; Rahman *et al.*, 2006). Una antocianina que lleva un azúcar extra en HO-3 (como por ejemplo un disacárido), tiene una actividad antioxidante menor que una antocianidina con una sola molécula de azúcar (Terahara *et al.*, 2001).

La acilación de una antocianina con ácido *p*-cumárico produjo un aumento significativo en la actividad antioxidante, probablemente debido a la actividad antioxidante del propio ácido *p*-cumárico. Aparentemente, por la misma razón, los derivados de

delfinidina acilados con ácido cafeico mostraron una actividad antioxidante mayor que sus respectivos compuestos desacilados (Azuma *et al.*, 2008). La diacilación de la antocianina aumentó notablemente la actividad antioxidante, pero la 5-*O*-glicosilación disminuyó la actividad (Stintzing *et al.*, 2002).

La resonancia dentro de la unidad de antocianidina es importante para la estabilidad de los radicales formados en las antociani(di)nas y afecta la reactividad de estos compuestos, de acuerdo con la condición 3 de Bors. En un estudio, kuromanina tuvo la actividad ORAC más alta entre 14 antocianidinas y antocianinas, la cual fue 3,5 veces más fuerte que Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un análogo de la vitamina E), mientras que pelargonidina tuvo la actividad antioxidante más baja pero aún tan potente como Trolox (Wang *et al.*, 1997). La apigeninidina, que tiene HO-5 y HO-7, tuvo una actividad reductora baja hacia DPPH[•] y una actividad baja pero mucho más alta contra ABTS^{•+}. El radical apigeninidina, al deshidrogenarse, sólo puede tener resonancia de los radicales HO-5 o HO-7 a través del oxígeno del pirilio (**Figura 3.3**). Crisina tiene una estructura similar a apigeninidina pero sin HO-4'. Ambas antocianidinas presentaron similar actividad de captación hacia ABTS^{•+} (Rice-Evans *et al.*, 1996), lo que indica la presencia de efectos de estabilización similares de la resonancia del radical en HO-4' y de la resonancia de los radicales en HO-5 o HO-7 (**Figura 3.3**).

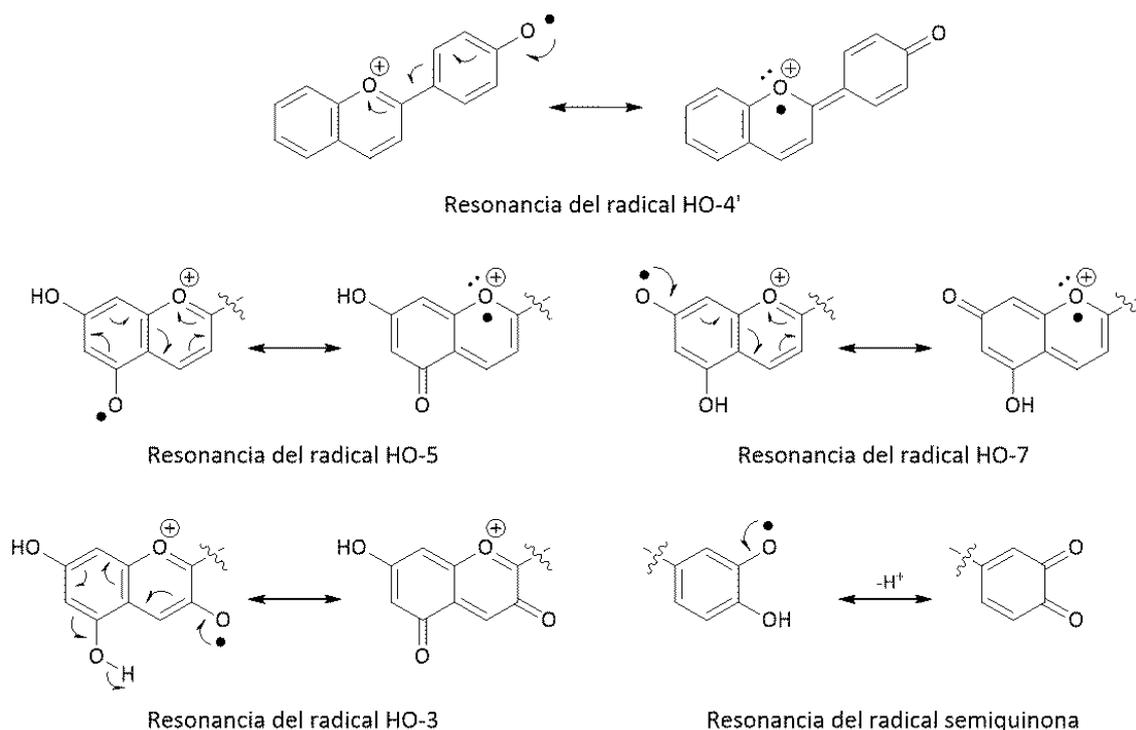


Figura 3.3. Resonancia de estabilización de varios radicales de antocianidina. Reproducido de (Ali *et al.*, 2016), con autorización.

La mayoría de las antocianidinas y antocianinas mostraron actividad reductora más alta que Trolox. Los compuestos más activos hacia todos los radicales fueron quercetagetinidina, delfinidina, petunidina y sus antocianinas, mientras que los compuestos menos activos contra todos los radicales fueron apigeninidina, pelargonidina y pelargonidina-3-*O*-glucósido. En el ensayo FRAP, las antocianidinas y antocianinas, excepto apigeninidina, mostraron buena capacidad de donación de electrones, más alta que Trolox

(Ali *et al.*, 2016). La alta actividad de quercetagetinidina en los ensayos ABTS' y en FRAP se puede atribuir a la presencia inusual de un HO-6 adicional.

Pelargonidina tiene una estructura similar a apigeninidina, pero con un HO-3 adicional; mostró actividad significativamente mayor contra todos los radicales. La mayor actividad se puede atribuir a la resonancia del radical HO-3 entre HO-3 y HO-5, HO-7 o HO-4', y la formación de un producto dicetónico estable, que impulsa la reacción de transferencia de hidrógeno hacia adelante. Los radicales formados en HO-5-, HO-7 o HO-4' también se pueden estabilizar por la misma resonancia en la dirección opuesta. Este efecto de resonancia es similar al de la estructura de catecol, donde se forman radicales semiquinona estables, lo que lleva a dicetonas estables (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2015). Se informó que la presencia de HO-3 conjugado con un doble enlace aumenta la actividad antioxidante en otras clases de flavonoides. Esta característica estructural permite la coplanaridad del anillo B con los anillos A y C, lo que provoca la extensión de la conjugación y de la deslocalización electrónica, y conduce a una estabilidad extra de los radicales resultantes (Heim *et al.*, 2002; Balasundram *et al.*, 2006).

Cianidina, que tiene un HO-3' adicional respecto a pelargonidina, mostró una mayor actividad atrapante de radicales, debido a la estructura de catecol en el anillo B que permite la conocida estabilización de un radical semiquinona y la formación de un producto estable de quinona. Petunidina mostró una mayor actividad atrapante contra todos los radicales que cianidina, ya que tiene una estructura de catecol pero con un grupo metoxilo más. Los reductores más fuertes en el ensayo FRAP fueron delfinidina, petunidina, cianidina y sus antocianinas, más quercetagetinidina, lo que confirma que una unidad de catecol mejora no sólo la actividad atrapante de radicales sino también la capacidad de donación de electrones de las antocianidinas y antocianinas, como se mencionó anteriormente.

Delfinidina tiene más grupos hidroxilo (HO-5'adicional) que cianidina en el anillo B (estructura de pirogalol), lo que aumenta la actividad atrapante de radicales. Quercetagetinidina tiene una unidad de pirogalol en el anillo A y una unidad de catecol en el anillo B y, por lo tanto, también tiene mayor actividad que cianidina contra los tres radicales (Ali *et al.*, 2016).

Otro estudio mostró la siguiente secuencia de reactividad: cianidina-3-*O*-glucósido \approx cianidina-3,5-*O*-diglucósido > delfinidina-3-*O*-glucósido > pelargonidina-3-*O*-glucósido en el ensayo de decoloración DPPH'; cianidina-3-*O*-glucósido > cianidina-3,5-*O*-diglucósido > pelargonidina-3-*O*-glucósido > delfinidina-3-*O*-glucósido en el ensayo ABTS'; y cianidina-3,5-*O*-diglucósido \approx cianidina-3-*O*-glucósido > delfinidina-3-*O*-glucósido > pelargonidina-3-*O*-glucósido en el ensayo FRAP (Hu *et al.*, 2023). En un trabajo subsiguiente, las concentraciones necesarias para atrapar el 50% de DPPH' en el ensayo (valores de concentración efectiva al 50% (CE₅₀)) fueron 3,74, 4,85, 5,25, 7,29 y 10,9 μ M para delfinidina, cianidina, pelargonidina, kuromanina y calistefina respectivamente (de Lima *et al.*, 2007). En otro estudio, los valores de CE₅₀ de kuromarina, petunidina-3-*O*-glucósido, mirtilina, oenina y cianidina-3-*O*-rutinósido para atrapar DPPH' fueron 6,61, 6,61, 6,90, 7,48 y 8,78 μ M respectivamente, inferiores o comparables a los del ácido ascórbico (7,28 μ M) (Gonçalves *et al.*, 2024). El análisis de la relación estructura-actividad (SAR, *Structure-Activity Relationship*) señala que peonidina debería tener una actividad menor que cianidina, ya que tiene la misma estructura con metilación del HO-3' y carece de la

estructura de catecol. Por otro lado, tiene una actividad mayor que pelargonidina debido al $\text{H}_3\text{CO}-3'$ adicional (Ali *et al.*, 2015); otros autores obtuvieron resultados similares (Kähkönen & Heinonen, 2003). De manera análoga a peonidina, malvidina carece de una estructura de catecol pero tiene un grupo metoxilo adicional en C-5', por lo que tiene una mayor actividad. El efecto electrónico de los sustituyentes tiene una gran influencia tanto en la energía de activación como en la energía de disociación del enlace O-H de los fenoles (Foti *et al.*, 2008).

Por lo tanto, comparando la actividad de compuestos que carecen de la estructura de catecol, la actividad contra DPPH[•] y ABTS[•] disminuye en este orden: malvidina > peonidina > pelargonidina > apigeninidina que corresponde a la presencia de 6, 5, 4, 3 y 1 grupos hidroxilo y/o metoxilo respectivamente. El mismo orden de actividad (malvidina > peonidina > pelargonidina) se encontró experimentalmente en el ensayo ORAC (Wang *et al.*, 1997) y se predijo teóricamente en base al cálculo de la energía de disociación del enlace O-H (Guzmán *et al.*, 2009) y en la comparación del poder reductor medido por el ensayo FRAP, lo que sugiere factores similares que afectan tanto al poder reductor como a la actividad atrapante de radicales de las antocianidinas y antocianinas. Se observó que el poder reductor aumenta con el número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B (Balasundram *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2010). También que un compuesto que carece de una estructura de catecol, como por ejemplo malvidina con cuatro grupos hidroxilo y metoxilo, puede tener actividad atrapante similar, o incluso mejor, que la de un compuesto que posee una estructura de catecol, como por ejemplo cianidina con sustituyentes menos estabilizantes.

3.4. Reacciones de antocianidinas y antocianinas con especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

Las antocianidinas y antocianinas reaccionan con superóxido, óxido nítrico y peroxinitrito; estas reacciones inducen la decoloración de estos compuestos (Yamasaki *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2006). Tanto la estructura de aglicona como la unidad de azúcar unida afectaron la actividad atrapante de superóxido y peroxinitrito, si bien el efecto de la unidad de azúcar unida fue menor que el de la estructura de la aglicona. La actividad hacia el radical superóxido aumentó en el siguiente orden: delphinidina > petunidina > malvidina \approx cianidina > peonidina > pelargonidina (Rahman *et al.*, 2006). Otro estudio mostró que los valores de CE_{50} para atrapar superóxido fueron 6,96, 29,39, 31,24, 31,51, 45,94 y 207,20 μM para petunidina-3-O-glucósido, kuromarina, oenina, mirtilina, cianidina-3-O-rutinósido y ácido ascórbico respectivamente (Gonçalves *et al.*, 2024).

Los cálculos cinéticos basados en la mecánica cuántica mostraron que las antocianidinas son potentes atrapantes de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroperoxilo (HOO^{\bullet}) en medios polares (Vo *et al.*, 2021).

Los valores de CE_{50} para atrapar óxido nítrico en las condiciones experimentales aplicadas a cianidina, oenina, mirtilina, cianidina-3-O-rutinósido y petunidina-3-O-glucósido fueron 15,58, 11,81, 15,52, 18,14 y 34,17 μM respectivamente, mucho más bajos

que con el ácido ascórbico (1432 μM) (Gonçalves *et al.*, 2024). La comparación de la reactividad de varias antocianinas con óxido nítrico mostró la siguiente secuencia de reactividad: petunidina-3-*O*-galactósido > peonidina-3-*O*-galactósido > cianidina-3-*O*-glucósido > malvidina-3-*O*-galactósido > cianidina-3-*O*-galactósido > cianidina-3-*O*-arabinósido > peonidina-3-*O*-glucósido > petunidina-3-*O*-glucósido = malvidina-3-*O*-glucósido > delphinidina-3-*O*-glucósido > delphinidina-3-*O*-galactósido > delphinidina-3-*O*-arabinósido. La secuencia de reactividad con peroxinitrito fue la siguiente: peonidina-3-*O*-galactósido > petunidina-3-*O*-galactósido > cianidina-3-*O*-glucósido > cianidina-3-*O*-arabinósido > peonidina-3-*O*-glucósido > malvidina-3-*O*-glucósido > malvidina-3-*O*-galactósido > petunidina-3-*O*-glucósido = cianidina-3-*O*-galactósido > delphinidina-3-*O*-arabinósido > delphinidina-3-*O*-galactósido > delphinidina-3-*O*-glucósido (Ichiyangi *et al.*, 2004). Para las antocianidinas, la secuencia de reactividad hacia el peroxinitrito fue la siguiente: delphinidina > cianidina \approx petunidina > malvidina > peonidina > pelargonidina. La metilación de HO-4' redujo notablemente la actividad antioxidante de las antocianidinas (Rahman *et al.*, 2006). Apigeninidina mostró un comportamiento diferente frente a distintos radicales, sin actividad frente a los radicales hidroxilo y óxido nítrico, pero con buena actividad frente a los radicales lipídicos y ascorbilo (Boveris *et al.*, 2001).

Las antocianinas y antocianidinas protegen a las proteínas de la nitración por peroxinitrito, siendo ellas mismas nitradas y degradadas. En el caso de pelargonidina, los principales productos de reacción fueron el ácido *p*-hidroxibenzoico y el ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoico (Tsuda *et al.*, 2000).

La eficiencia de la captura de radicales peroxilo por varias antocianinas se relacionó con los sustituyentes del anillo B y mostró el orden: $-\text{OH} > -\text{OCH}_3 \gg -\text{H}$ como se infiere de la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico, por ejemplo, se encontró que delphinidina-3-*O*-glucósido, que tiene dos sustituyentes $-\text{OH}$ en C-3' y C-5', era ocho veces más eficiente que pelargonidina-3-*O*-glucósido con dos H en 3' y 5' (Rossetto *et al.*, 2007). Es interesante que, la *O*-glicosilación en HO-3 y HO-5 de la antocianidina potencia la intensidad de la quimioluminiscencia dependiente de la peroxidación lipídica (Yoshiki *et al.*, 1995). Las antocianinas reaccionan también con peróxido de hidrógeno. La contribución de las antocianidinas a la captación de H_2O_2 en la cáscara de manzana es mayor que la de otros compuestos fenólicos (Bi *et al.*, 2014).

Todas las antocianinas y antocianidinas fueron antioxidantes muy efectivos contra el sistema liposomal y disminuyeron la formación de malondialdehído (MDA) por la irradiación UVB (320–290 nm). La inhibición de la oxidación de LDL (*low density lipoprotein* = lipoproteína de baja densidad; colesterol malo) por antocianinas se explicó por varios mecanismos antioxidantes, como: la donación de hidrógeno, la quelación de metales y la unión a proteínas (Brown y Kelly, 2007).

Las antocianinas y antocianidinas inhibieron de manera dependiente de la dosis la peroxidación de LDL mediada por Cu^{2+} . El orden de eficiencia en la extensión del tiempo de retraso (*lag time*) fue el siguiente: cianidina > delphinidina > cianidina-3-*O*-glucósido > malvidina > malvidina-3-*O*-glucósido. Las antociani(di)nas con la disposición *o*-dihidroxilo, como cianidina, quelan iones Cu^{2+} , lo que, en parte, explica su mayor eficacia sobre los otros (poli)fenoles en este sistema de oxidación modelo (Jaldappagari *et al.*, 2008). En un sistema liposomal, la eficiencia de inhibición de la peroxidación lipídica aumentó con un número

creciente de sustituyentes hidroxilo presentes en el anillo B. Sin embargo, la sustitución por grupos metoxilo disminuyó la actividad antioxidante de las antocianidinas. La sustitución en C-3 del anillo C jugó un papel importante en la determinación de su eficacia en la inhibición de la peroxidación lipídica. Las antocianidinas, que poseen un HO-3, demostraron potente actividad antioxidante. Para las cianidinas, el número creciente de unidades de glicosilo en C-3 resultó en una disminución de la actividad antioxidante (Seeram & Nair, 2002).

3.5. Propiedades electroquímicas de las antocianinas y antocianidinas

Los estudios electroquímicos son otra fuente de datos sobre las tendencias generales en la capacidad de donación de electrones de las antocianinas. Se estudiaron las propiedades de delfinidina, cianidina, pelargonidina, kuromanina y calistefina. Los picos de potencial menos positivos que muestran estos compuestos corresponden a oxidaciones de los grupos OH más redox-activos del anillo B. Los potenciales se vuelven sucesivamente más positivos para la oxidación del grupo HO-3 y de los grupos resorcinol del anillo A. Delfinidina mostró cuatro procesos de oxidación; los dos picos menos positivos corresponden a la oxidación de HO-3', HO-4', HO-5', el tercer proceso corresponde a la oxidación de HO-3 y el cuarto proceso a la oxidación de HO-5, HO-7. Los mismos procesos se observaron para cianidina, excepto por el hecho de que los dos picos menos positivos correspondieron a oxidaciones de HO-3', HO-4' (de Lima *et al.*, 2007).

Los datos de voltamperometría diferencial de pulso para la oxidación de antocianinas arrojaron valores de dos picos de oxidación, P₁ y P₂, asociados con los dos centros oxidables para varias antocianinas y antocianidinas (Janeiro & Brett, 2007). Los datos indican la siguiente secuencia de oxidación del grupo HO-4' del anillo B: un grupo hidroxilo en la estructura de pirogalol (como en mirtilina) > un grupo hidroxilo en la posición *orto* a dos grupos metoxilo (como en oenina) > un grupo hidroxilo en la posición *orto* a un grupo metoxilo (como en petunidina).

Una reacción de oxidación reversible ocurre sólo cuando un grupo HO-4' tiene un grupo metoxilo vecino en la posición *orto*. Cuando el grupo hidroxilo se encuentra en la posición *orto*, junto a dos grupos metoxilo, la reacción se vuelve irreversible. La glicosilación del anillo A no afecta el potencial de pico de oxidación de los grupos hidroxilo en el anillo B. Se observó una oxidación irreversible de los grupos hidroxilo en el anillo A a valores positivos más altos del potencial (Janeiro & Brett, 2007).

3.6. Efecto de las interacciones sobre la actividad antioxidante de las antocianinas

Los espectros de absorción de cianidina mostraron un desplazamiento batocrómico de aproximadamente 15 nm cuando se mezcló con ADN de timo de ternera, lo que indica la formación de un complejo. La formación del complejo protegió tanto a la antocianidina como al ADN del daño oxidativo por radicales hidroxilo, si bien no se realizó ninguna cuantificación del alcance del daño (Sarma & Sharma, 1999). Es obvio que en una mezcla de compuestos, cada uno de ellos está protegido por otro compuesto que actúa como sustrato competitivo para un radical con baja especificidad de sustrato, como el radical hidroxilo. Sin embargo, la formación de complejos puede ocultar grupos susceptibles dentro del complejo; lo cual se postuló para el complejo antocianina-ADN donde un grupo flavilio cargado positivamente se une probablemente al grupo fosfato cargado negativamente del ADN (Sarma & Sharma, 1999).

De manera similar, la unión a proteínas, como la albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*), protegió a las antocianinas contra la degradación y pérdida de actividad antioxidante inducida por la luz y el ascorbato (Zang *et al.*, 2022). Se demostró que la estabilidad de la antocianina y la actividad antioxidante también se mejoran mediante la interacción con suero y otras proteínas (Li *et al.*, 2021a; Zang *et al.*, 2021).

Las interacciones de las antocianinas con otros flavonoides (co-pigmentos) pueden afectar su actividad antioxidante. En el ensayo DPPH', la interacción de las antocianinas con otros flavonoides produjo principalmente efectos antagónicos débiles, si bien se encontró un efecto sinérgico en una mezcla de kuromanina y miricetina-3-*O*-glucósido (Hidalgo *et al.*, 2010). También se encontraron efectos sinérgicos de las antocianinas, taninos hidrolizables y/o compuestos poliméricos, que dieron como resultado una mayor actividad de captación de radicales de sus mezclas (Kostka *et al.*, 2020).

Las antocianinas forman complejos con los iones metálicos mediante HO-3, HO-5 o grupos *orto*-dihidroxilo en el anillo B (Nimse & Pal, 2015) (**Figura 3.4**). Esta actividad quelante de iones metálicos de las antocianinas es importante para la inhibición de las reacciones de oxidación catalizadas por metales, especialmente la peroxidación lipídica (Jaldappagari *et al.*, 2008).

La co-pigmentación permite la formación de un color azul en algunas flores, gracias a la interacción entre la base quinoidal con otros compuestos, especialmente iones metálicos. La formación de complejos con metales estabiliza la base quinoidal ionizada, ya que los átomos de oxígeno que participan en la unión con metales ya no están disponibles para las reacciones de oxidación, lo que disminuye la capacidad antioxidante de las antocianinas y evita su degradación en reacciones con oxígeno (Moncada *et al.*, 2003; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009) Sin embargo, la interacción con iones de metales de transición *in vitro* puede conducir a la actividad pro-oxidante de las antocianinas, de manera similar a otros flavonoides (Eghbaliferiz *et al.*, 2016).

Las antocianinas también evitan la oxidación del ácido ascórbico, mediante la formación de quelatos con los iones metálicos y, finalmente, por la formación de un complejo ácido ascórbico-metal-antocianina (Jaldappagari *et al.*, 2008).

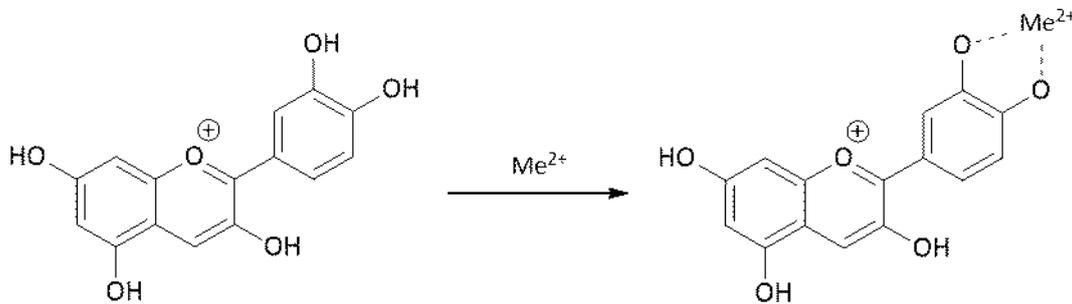


Figura 3.4. Unión de metales a las antocianidinas, ejemplificada con cianidina (Nimse & Pal, 2015).

3.7. Efectos antioxidantes de las antocianinas en células, animales de experimentación y en humanos

Numerosos estudios han demostrado la actividad antioxidante de las antocianinas y antocianidinas a nivel celular, tanto en células intactas como en células desafiadas con diversos agentes, simulando variadas condiciones fisiopatológicas (Hu *et al.*, 2023; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024).

Los experimentos celulares *in vitro* tienen limitaciones, como: 1) Al estudiar extractos de plantas, las células se exponen a una mezcla de compuestos, algunos de los cuales no pueden alcanzarlas *in vivo* debido a la barrera de permeabilidad. 2) La transformación de las antocianinas en sus metabolitos por la microbiota intestinal y los sistemas de desintoxicación del cuerpo puede producir metabolitos que no están presentes en el medio de cultivo (Talavéra *et al.*, 2005; Eker *et al.*, 2019; Gui *et al.*, 2023). 3) Los compuestos fenólicos en los medios de cultivo celular, con concentración de oxígeno mucho más alta que dentro del organismo y pH casi neutro, están sujetos a auto-oxidación, produciendo, en última instancia, peróxido de hidrógeno. Este fenómeno puede conducir a falsos resultados experimentales (Long *et al.*, 2010; Grzesik *et al.*, 2019), debido a lo cual, los resultados de los experimentos *in vitro* no siempre se extrapolan directamente a los efectos que podrían lograrse *in vivo*.

También se han publicado muchos resultados sobre el impacto de los compuestos ricos en antocianinas en los parámetros de estrés oxidativo en animales y seres humanos sanos, en animales sometidos a diversos tratamientos y en pacientes con diversas enfermedades (Powers & Jackson, 2008; Gomez-Cabrera *et al.*, 2012; Lorzadeh *et al.*, 2022; Bahari *et al.*, 2023; Stote *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023; Jiménez-Gallardo *et al.*, 2024; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024).

Un meta-análisis de ensayos controlados aleatorios sobre el efecto de las antocianinas dietarias en los biomarcadores del estrés oxidativo, basado en 23 artículos, mostró que la administración de antocianinas dietarias disminuyó los niveles de MDA, lipoproteína

oxidada de baja densidad (Ox-LDL, *oxidized low-density lipoprotein*) e isoprostano, al tiempo que aumentó el nivel de capacidad antioxidante total (TAC, *total antioxidant capacity*) y la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión-peroxidasa (GPx) en los eritrocitos. Las antocianinas dietarias fueron más útiles para los sujetos no saludables que para los sanos (Fallah *et al.*, 2020). Una revisión sistemática reciente señaló la eficacia de los alimentos y nutracéuticos que contienen antocianinas para mitigar el estrés oxidativo asociado con la enfermedad cardiovascular (Mohammadi *et al.*, 2024).

Un meta-análisis de 39 estudios observó el efecto de las antocianinas dietarias en la recuperación del ejercicio. En la mayoría de los estudios, las antocianinas aumentaron TAC y disminuyeron SOD inmediatamente después del ejercicio, y el efecto más beneficioso sobre los biomarcadores se observó después del ejercicio metabólicamente sesgado y las intervenciones a largo plazo (Kimble *et al.*, 2023). Un meta-análisis de ocho estudios mostró que la intervención con antocianinas en pacientes sometidos a hemodiálisis disminuyó los parámetros de estrés oxidativo, especialmente el nivel de MDA (Martins *et al.*, 2023).

Recientemente se revisó la protección contra los efectos de los contaminantes transmitidos por los alimentos, incluido el estrés oxidativo, por parte de los antioxidantes (Jiang *et al.*, 2024).

3.8. Acción directa e indirecta de las antocianinas

El efecto protector de las células por los agentes antioxidantes ante el daño causado por ROS/RNS puede deberse a la *acción antioxidante directa* (en el caso de las células cultivadas cuando el antioxidante está presente en alta concentración), pero es muy poco probable que este efecto sea importante *in vivo*, especialmente para las antocianinas. Estos compuestos se caracterizan por una baja biodisponibilidad y alcanzan una concentración máxima en el rango micromolar bajo en los fluidos corporales cuando se ingieren (Fang, 2014; Fernandes *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2018). Estas concentraciones son insignificantes en comparación con otros antioxidantes presentes en el interior de las células en concentraciones milimolares. La encapsulación de antocianinas puede ser una forma eficiente de sortear esta limitación, permitiendo la suplementación con dosis más altas de antocianinas y evitando su degradación yeyunal (Mohammadinejad & Kurek, 2021; Rashwan *et al.*, 2023).

Los efectos antioxidantes beneficiosos de las antocianinas en el organismo parecen deberse más bien a la estimulación de los propios sistemas de defensa antioxidante de las células (Forman *et al.*, 2014). Muchos autores registran aumento, atenuación o disminución, en la actividad de las enzimas antioxidantes y el nivel de glutatión. Estos *efectos antioxidantes indirectos* se deben a la influencia de las antocianinas en la expresión génica y las vías de señalización y deberían clasificarse más bien como efectos de señalización. El aumento de los antioxidantes endógenos y la mejora del estado oxidativo pueden estar mediados por varios mecanismos, incluida la activación del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2, *nuclear erythroid 2-related factor-2*) y la acción antiinflamatoria, ya que la inflamación intensifica el estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2018).

Se ha documentado que el consumo de antocianinas implica interferencia con las vías de señalización, incluido Nrf2, lo que lleva a la activación de la biosíntesis de proteínas antioxidantes y del factor nuclear *kappa* B (NFκB), y la inhibición de la inflamación (Li *et al.*, 2021b).

Nrf2 es un factor de transcripción que se une a una secuencia específica de ADN llamada ARE (*Antioxidant Response Element*; elemento de respuesta antioxidante). En condiciones normales, Nrf2 se asocia a la proteína Keap1 (*Kelch Like ECH Associated Protein 1*), que lo marca para degradación. Sin embargo, en presencia de estrés oxidativo, Nrf2 se estabiliza y se transloca al núcleo, donde se dimeriza con otras proteínas para activar a los AREs.

El consumo de bebidas ricas en antocianinas por voluntarios sanos afectó a Nrf2 y la transcripción génica dependiente de Nrf2 en linfocitos periféricos humanos y la integridad del ADN, lo que es indicativo de efectos sistémicos (Groh *et al.*, 2020). El efecto protector del extracto de antocianinas de pétalos de *Hibiscus syriacus* sobre queratinocitos epidérmicos humanos de alta sensibilidad HaCaT tratados con H₂O₂ se asoció con la activación de Nrf2 (Molagoda *et al.*, 2020). El pretratamiento con cianidina-3-*O*-glucósido en células endoteliales de la vena umbilical humana activó la vía Nrf2/ARE al inicio y después del tratamiento con el factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF-α) (Speciale *et al.*, 2013).

La vía Nrf2/ARE es un mecanismo de defensa celular que se activa en respuesta al estrés oxidativo, y que regula la expresión de genes que codifican enzimas desintoxicantes y antioxidantes. Está presente en todos los tejidos humanos, incluido el cerebro. El sistema Nrf2/ARE contribuye a la protección contra diversas patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación. Sin embargo, la regulación de Nrf2 se altera en condiciones patológicas, haciendo a la célula vulnerable ante el daño.

Los efectos beneficiosos de las antocianinas en enfermedades neurodegenerativas, que implican la atenuación del estrés oxidativo de estas enfermedades y tal vez contribuyen a sus mecanismos, también interfieren con las vías de señalización que incluyen Nrf2 y NFκB (Li *et al.*, 2021b), y la inhibición de la inflamación. Se ha analizado la modulación del estrés oxidativo por cianidina-3-glucósido, mediada por la vía Nrf2 (Rahman *et al.*, 2021).

Otro factor importante que puede mediar el efecto de las antocianinas sobre el estrés oxidativo es el efecto sobre el microbioma intestinal (Zhong *et al.*, 2023). Se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en antocianinas ejerce una serie de efectos antioxidantes en todo el cuerpo. No obstante, a menos que se haya utilizado un extracto puro de antocianinas, otros antioxidantes presentes en los alimentos podrían haber contribuido a estos efectos (Duthie *et al.*, 2006; Titta *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2017; Bakuradze *et al.*, 2019; Mikhailova *et al.*, 2023; Tony *et al.*, 2023).

3.9. Conclusiones del Capítulo 3

Las investigaciones recientes permiten predecir un incremento en el uso de antocianinas como colorantes naturales en diversos productos durante los próximos años. Considerando el efecto beneficioso para la salud de las antocianinas, su incorporación en la industria de alimentos y bebidas representa un valor agregado importante.

El análisis de la capacidad antioxidante de las antocianinas y sus métodos de evaluación, y los principales parámetros que influyen en su estabilidad lleva a mejorar su aplicación tanto alimentaria como cosmética y terapéutica. Varios factores pueden afectar a su estabilidad e, implícitamente, a su biodisponibilidad.

Además de su uso principal, como pigmentos, las antocianinas también tienen importantes propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antitumorales, antimutagénicas y antidiabéticas. Para aprovechar al máximo estas propiedades de las antocianinas, es importante conocer cómo su estabilidad se ve influenciada por el pH, la temperatura, la copigmentación, el oxígeno, el ácido ascórbico, la luz, los sulfitos o las enzimas.

En resumen, las antocianinas son buenos antioxidantes y atenúan el estrés oxidativo a nivel celular y del organismo. Sin embargo, considerando su baja biodisponibilidad y transformaciones metabólicas, se debe considerar que sus efectos en el organismo son principalmente de naturaleza indirecta, mediados por la activación de sus propios sistemas antioxidantes del cuerpo y, en muchos casos, pueden estar mediados por sus metabolitos. Sin embargo, independientemente del mecanismo de acción, los efectos antioxidantes y otros efectos beneficiosos de las antocianinas, dependientes o independientes de sus propiedades antioxidantes, justifican plenamente las recomendaciones del consumo diario de productos alimenticios ricos en estos compuestos (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2024).

Para ampliar su eficacia, se considera positivo incorporar a las antocianinas en sistemas de distribución dirigida y, por tanto, la carga del compuesto se proyecta por el entorno externo que podría influir en su estabilidad. Se han desarrollado diversos sistemas como: liposomas, microcápsulas o emulsiones para aumentar su biodisponibilidad, por lo que, implícitamente, los efectos producidos por las antocianinas serían más fuertes. No obstante, estudios futuros permitirán disminuir su impacto negativo.

La implementación de mejores metodologías de extracción, purificación e identificación primero en laboratorio y luego a escala de planta piloto, así como las metodologías de su distribución en el organismo humano, tendrá un impacto en el costo de estos colorantes y sus estándares, así como en la autenticación de productos alimenticios y el descubrimiento de adulteraciones sofisticadas.

En el Capítulo 4 abordamos el aislamiento, purificación e identificación de antocianinas aciladas bioactivas provenientes de fuentes naturales obtenidas en esta Tesis, con la determinación de su estabilidad y constantes de velocidad de degradación relativa, así como su respuesta ante la captación de DPPH[•] de las antocianinas mayoritarias.

**Capítulo 4. Estudio estructural de Antocianinas
Aciladas aisladas de *Ipomoea cairica***

4.1. Introducción al estudio de antocianinas aciladas de *Ipomoea cairica*



Las antocianinas revisten interés, como hemos visto, debido a su uso potencial como colorantes alimentarios en lugar de los sintéticos (He y Giusti, 2010). Además, las antocianinas aciladas poseen mayor estabilidad que las antocianinas comunes, y son lo suficientemente seguras para ser utilizadas como pigmentos alimentarios, como por ejemplo: las antocianinas aciladas de repollo colorado, zanahorias moradas, rábanos rojos y papas rojas (Bąkowska-Barczak, 2005). Han demostrado una baja sensibilidad a los cambios de pH y una mayor estabilidad al calor y a la luz. Por lo tanto, las antocianinas aciladas son adecuadas no sólo para alimentos con pH bajo sino también para productos neutros y ligeramente alcalinos, como productos lácteos, postres en polvo y preparados (Bąkowska-Barczak, 2005). Sin embargo, otras antocianinas hidrosolubles naturales son algo inestables en solución, especialmente a alta temperatura y en presencia de exceso de oxígeno. Por lo tanto, estos compuestos deben ser estabilizados antes de su uso.

La elucidación de las estructuras de nuevas antocianinas aciladas es una tarea desafiante debido a la complejidad de los compuestos, su sensibilidad a la luz, al oxígeno de la atmósfera, al pH y a la temperatura. Para obtener las estructuras químicas completas se debe evaluar cuidadosamente el tipo, el número y la posición de las unidades de acilo.

En esta Tesis ilustramos la elucidación de las estructuras de siete antocianinas aciladas y dos desaciladas de *Ipomoea cairica* (familia Convolvulaceae), mostrando diferentes grados de complicación estructural debido a la posición de glicosilación y acilación en compuestos muy similares, algunas de las cuales habíamos identificado parcialmente hace algún tiempo (Pomilio & Sproviero, 1972 a,b,c). Se describen la extracción, la separación, la purificación y la identificación completa de nuevas antocianinas aciladas con derivados del ácido cinámico unidos al disacárido soforosa (2-O- β -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranososa).

Estas antocianinas aciladas y desaciladas mostraron actividad antioxidante, antimutagénica e hipoglucémica. Se ha analizado la estabilidad estructural debido al potencial uso comercial de estos compuestos.

4.2. Género *Ipomoea*



El género *Ipomoea* (familia Convolvulaceae (Eich, 2008)) comprende casi 700 especies de plantas ornamentales, alimenticias, medicinales y enteogénicas, que crecen en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los usos tradicionales, la química y la bioactividad de estas especies han sido registradas (Meira *et al.*, 2012).

El género *Ipomoea* en Bolivia ha sido revisado (Wood *et al.*, 2015), indicando la ubicación donde crecen algunas especies de *Ipomoea* en Argentina y Brasil. *I. cairica* es señalada como una especie pantropical, introducida en Bolivia, creciendo hasta 2600 m, frecuentemente recolectada en la región andina. Además, a nivel del mar crece fácilmente como especie silvestre, como se puede observar en la ciudad de Buenos Aires y alrededores (Argentina).

Varias especies de *Ipomoea* se han utilizado con fines nutricionales, medicinales, rituales y agrícolas, es decir, *I. batatas* (L.) Lam. (Bovell-Benjamin, 2007; Mohanraj y Sivasankar, 2014), *I. alba* L., *I. albivenia* (Lindl.) Sweet., *I. involucreta* P. Beauv., *I. leptophylla* Torr. e *I. aquatica* Forsk como alimentos; esta última contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales en cantidades comparables a la soja o al huevo entero, y bioelementos como calcio, magnesio, hierro, zinc y cobre. Otras especies de *Ipomoea* son fitotóxicas, como *I. tricolor* Cav. que se utiliza en Méjico contra malezas invasoras (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). También existen especies enteogénicas como *I. corymbosa* (L.) Roth ex Roem. & Schult. e *I. violaceae* L. que se utilizan desde tiempos precolombinos en Méjico durante ceremonias religiosas y prácticas curativas debido al contenido de alcaloides del ergot (o del cornezuelo) (Meira *et al.*, 2012).

Los constituyentes bioactivos más comunes de estas plantas son compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas, glicolípidos, alcaloides de ergolina, alcaloides de indolizidina, alcaloides de nortropano, cumarinas, norisoprenoides, diterpenos, isocumarinas, lignanos y triterpenos (Meira *et al.*, 2012; Ralte, 2014).

Varios compuestos se han aislado previamente de *I. cairica* y se han determinado su bioactividad (**Tabla 4.1**). Estudios farmacológicos han demostrado que diferentes partes de esta planta poseen propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, levaduras y hongos (Ferreira *et al.*, 2006a,b; Arora *et al.*, 2013), anti-virus del SIDA (virus de inmunodeficiencia humana, VIH) (Schröder *et al.*, 1990; Eich *et al.*, 1996;

Yao *et al.*, 2011; Barkat *et al.*, 2014), antidiabéticas. (inhibición de la α -glucosidasa) (Anouar *et al.*, 2015; Ghani, 2015; Pan *et al.*, 2015), anti-virus respiratorio sincitial (RSV, *Respiratory Syncytial Virus*) (Ma *et al.*, 2002). Los extractos de *I. cairica* también mostraron una capacidad neutralizante moderada contra el efecto hemorrágico del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* del noroeste de Colombia (Otero *et al.*, 2000). Las restantes bioactividades se muestran en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Compuestos orgánicos previamente aislados de *Ipomoea cairica*.

Compuestos	Propiedades/Bioactividades	Referencias
Cumarinas: <i>Escopoletina; umbeliferona</i>	Anticoagulantes	Sharda y Kokata 1979; Lima y Braz-Filho, 1997; Meira <i>et al.</i> , 2012.
Alcaloides indólicos		Sharda y Kokata 1979; Karawya <i>et al.</i> , 2010
Lignanos: <i>Arctigenina; matairesinol; traquelogenina</i>	Citotóxicas; antioxidantes; anti-inflamatorias; anti-VIH; anti-virus de la encefalitis japonesa	Sharda y Kokata 1979; Lima y Braz-Filho, 1997; Cho <i>et al.</i> , 2004; Brasileiro <i>et al.</i> , 2006; Swarup <i>et al.</i> , 2008; Yao <i>et al.</i> , 2011; Barkat <i>et al.</i> , 2014
<i>(+)-Pinoresinol</i>	Antioxidantes y antagonistas de Ca ²⁺	Páska <i>et al.</i> 2002
<i>(+)-(8R,8'S)-Tuyaplicatina metil éter; trans-2,3-dibencilbutirolactona</i>	Citotóxicas	Brasileiro <i>et al.</i> , 2006; Rong-Jyh <i>et al.</i> , 2008.
Ácidos quínicos: <i>Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico; ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico</i>	Antinociceptivas; anti-histamínicas; antioxidantes	Ferreira <i>et al.</i> , 2006 a
18 de los 20 aminoácidos de proteínas		Ferreira <i>et al.</i> , 2008
Esteroides: <i>Sitosterol; estigmasterol</i>		Singh <i>et al.</i> , 2013
<i>Sitosterol-3-O-glicopiranósido</i>		Ferreira <i>et al.</i> , 2006b
Glucósido de furanona: <i>Travelósido</i>		Ferreira <i>et al.</i> , 2006b
Triterpeno pentacíclico: <i>Friedelinol</i>		Ralte, 2014
<i>Ácido oleanólico y metabolitos</i>	Inhibidores de α -glucosidasa	Anouar <i>et al.</i> , 2015
Ácidos orgánicos: <i>Ácido vainillínico; ácido p-hidroxibenzoico; ácido metoxibenzoico; metilparabeno; ácido esteárico; ácido palmítico; ácido oleico</i>		Ralte, 2014

Ácidos grasos		Singh <i>et al.</i> , 2013
Acetofenonas: 4-Hidroxi-6-metoxi-2-(3',7'-dimetiloct-2',6'-enil)acetofenona; 4,6-dihidroxi-2-O-(4'-hidroxibutil)acetofenona		Singh <i>et al.</i> , 2013
Glicósidos acilados de la resina de pentasacárido: Cairicósidos A-F (macrolactonas del ácido simónico A, parcialmente aciladas con diferentes ácidos orgánicos). Cairicósidos I-IV Cairicósidos A y B	Citotoxicidad moderada Inhibidores de la α -glucosidasa	Yu <i>et al.</i> , 2013 Pan <i>et al.</i> , 2015 Li <i>et al.</i> , 2016
Aceite esencial	Herbicidas; larvicidas de mosquitos (vector de la encefalitis japonesa, del dengue, de la fiebre palúdica, de la filarisis linfática, del virus de la encefalitis de San Luis y del virus del Nilo)	Thomas <i>et al.</i> , 2004; Rajkumar y Jebanesan, 2007; Lallianrawna <i>et al.</i> , 2014; Thiagaletchumi <i>et al.</i> , 2014.
Néctar: Aminoácidos; azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa)		Galetto y Bernardello, 2004; Paiva y Martins, 2014
Flavonoides: 3,3',5-Trihidroxi-4',7-dimetoxi-flavona; 3,3',5-trihidroxi-4',7-dimetoxiflavona-3-O-sulfato	Propiedades alelopáticas; herbicidas	Ma <i>et al.</i> , 2009; Takao <i>et al.</i> , 2011.
Siete antocianinas aciladas y dos antocianinas desaciladas descritas en esta Tesis	Antioxidantes; antimutagénicas	(Pomilio & Sproviero, 1972 a) Identificación completa en esta Tesis.

4.3. Elucidación de las estructuras de las antocianinas aciladas de *Ipomoea cairica* realizada en esta Tesis

4.3.1. Antocianinas aciladas presentes en *Ipomoea cairica*

Como las antocianinas de *Ipomoea cairica* no habían sido estudiadas, excepto parcialmente hace algún tiempo en nuestros laboratorios (Pomilio & Sproviero, 1972a), abordamos el aislamiento e identificación de estos compuestos.

Seleccionamos flores abiertas frescas de *Ipomoea cairica* (L.) Sweet (sinónimo: *I. palmata* Forsk.) (nombre común: “campanilla”, “campanilla pequeña”, “gloria de la mañana costera”), de Argentina, para estudiar las estructuras de las antocianinas aciladas. *Ipomoea*

cairica es un arbusto trepador pantropical utilizado en la medicina tradicional de varios países del mundo.

Las antocianinas aciladas se extrajeron con metanol que contenía 0,1% HCl, y cada pigmento se separó mediante cromatografía en columna Diaion HP-20 (resina adsorbente, no polar, de copolímero estireno-divinilbenceno para cromatografía en fase reversa) y Sephadex LH-20 (resina reticulada a base de dextrano que se usa con fases móviles de solventes orgánicos para cromatografía de exclusión, permeación en gel, partición en fase normal y cromatografía de adsorción de lípidos, esteroides, ácidos grasos, y otros), cromatografía preparativa en papel (Whatman 3MM) utilizando *n*-butanol-ácido acético-agua (BAA, 4:1:5, en volumen; fase superior) como solvente, y se realizó una purificación fina por cromatografía líquida a mediana presión y, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*). Efectuamos además, cromatografía en capa delgada (TLC, *Thin Layer Chromatography*), analítica y preparativa, en placas de celulosa.

La extracción y la separación de las antocianinas son difíciles especialmente debido a su sensibilidad a la luz, oxígeno atmosférico, pH y temperatura, como se ha mencionado en el Capítulo 2. Sin embargo, las antocianinas aciladas parecen ser algo más estables, algunas de ellas resisten un pH cercano a 4 o neutro sin decolorarse. No obstante, las columnas se protegieron de la luz directa y se trabajó permanentemente en atmósfera de nitrógeno o de argón, incluyendo las corridas cromatográficas.

La determinación de las estructuras se realizó mediante métodos químicos (hidrólisis ácida parcial y total, hidrólisis alcalina y oxidación degradativa) y técnicas espectroscópicas [espectros UV-Vis y desplazamientos batocrómicos; ^1H -RMN y ^{13}C -RMN mono- y bidimensional (2D RMN) y espectrometría de masa (EM)]. Las relaciones de conexión entre la unidad de aglicona, los azúcares y los grupos acilo se efectuaron y confirmaron, para cada compuesto, mediante mediciones bidimensionales (2D RMN) como la correlación de enlaces múltiples heteronucleares o correlación heteronuclear de largo alcance (HMBC, *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* o *long-range H,C-COSY*) y la espectroscopía de aumento nuclear de Overhauser (NOESY, *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*). La técnica de HMBC ofrece un medio para identificar conectividades H-C a través de dos o más uniones. Esto permite abarcar heteroátomos y carbonos cuaternarios, los cuales, debido a no tener H unidos, bloquearían la secuencia de interacciones a lo largo de la cadena de un carbono protonado al siguiente. En HMBC, las correlaciones H/C entre las señales de cada unidad de azúcar y los átomos de carbono de la antocianidina fueron relevantes, así como los protones y los átomos de carbono de cada unidad de azúcar, y el protón del azúcar acilado y los átomos de carbono de los grupos acilo para proporcionar evidencia concluyente de la unión del acilo en cada caso.

De esta manera, se determinaron completamente las estructuras de los soforósidos de cianidina acilados con residuos de cafeoil y cumaroil, aislados de *Ipomoea cairica* (familia: Convolvulaceae), con una antocianina adicional conteniendo peonidina como aglicona, en lugar de cianidina.

4.3.2. Identificación de las antocianinas aciladas obtenidas de flores de *Ipomoea cairica*

Se obtuvieron siete antocianinas aciladas principales **1-7** y se determinaron las estructuras mediante métodos químicos (hidrólisis ácida y alcalina, oxidación con agua oxigenada) y análisis de datos espectroscópicos (espectros UV-Vis, intensidad de los picos, desplazamientos batocrómicos; ^1H -RMN y ^{13}C -RMN mono y bidimensional (2D RMN) y espectroscopía de masa (EM)). Otras antocianinas estaban presentes, pero en cantidades tan pequeñas que no fue posible estudiar las estructuras.

En la hidrólisis ácida, las antocianinas **1-6** dieron la misma aglicona, cianidina, *D*-glucosa como único azúcar y derivados del ácido cinámico como grupo acilo, mientras que la antocianina **7** se diferenció por contener peonidina en lugar de cianidina. Los compuestos **1, 4, 5, 6** y **7** dieron ácido cafeico, mientras que **2** y **3** produjeron ácido cafeico y ácido *p*-cumárico como agentes acilantes, mediante HPLC con muestras auténticas. La hidrólisis alcalina de las antocianinas **1** a **6** produjo sólo una antocianina desacilada (**8**).

El espectro de masa FAB de la antocianina desacilada **8** dio un ion molecular $[\text{M}]^+ = 773$ (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{O}_{21}$ 773,192). El espectro de ^1H -RMN de esta antocianina representó una molécula de cianidina (seis protones aromáticos) y tres moléculas de glucosa. Seis protones aromáticos se asignaron a los protones de cianidina. Las señales de protones de *D*-glucosa aparecieron en la región de δ_{H} 5,65-2,75, mostrando tres protones anoméricos a δ_{H} 5,62 (*d*, $J=7,0$ Hz; Glc-A, H-1^{''}), δ_{H} 4,70 (*d*, $J=7,0$ Hz; Glc-B, H-1^{'''}) y δ_{H} 5,16 (*d*, $J=7,0$ Hz; Glc-C, H-1^{iv}); las constantes de acoplamiento *vicinal* de estas unidades de glucosa mostraron $J=7,0-9,0$ Hz (Lobayan *et al.*, 2024). Por lo tanto, las tres unidades de glucosa correspondieron a: β -*D*-glucopiranosas. Mediante el análisis de ^1H - ^1H COSY de **8**, una señal de protón en δ_{H} 4,10 (*t*, $J=8,2$ Hz; Glc-B, H-1^{'''}) que se desplazaba hacia campos bajos se correlacionó directamente con H-2^{''} de Glc-A, indicando así que Glc-B está unida a HO-2^{''} de Glc-A mediante un enlace glicosídico. Por lo tanto, la antocianina desacilada **8** de las antocianinas **1-6** se identificó como: **Cianidina-3-*O*-[2^{''}-*O*-(β -*O*-glucopiranosil)- β -*D*-glucopiranosido]-5-*O*- β -*D*-glucopiranosido**, que es cianidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- β -*D*-glucósido (**Figura 4.1**). En la degradación con H_2O_2 de esta antocianina desacilada, se produjo soforosa.

En el caso de la antocianina acilada **7** se obtuvo como antocianina desacilada **9**: **Peonidina-3-*O*-[2^{''}-*O*-(β -*O*-glucopiranosil)- β -*D*-glucopiranosido]-5-*O*- β -*D*-glucopiranosido**, que es peonidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- β -*D*-glucósido (**Figura 4.1**).

Con fines comparativos, los datos espectroscópicos correspondientes a ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de las antocianinas desaciladas **8** y **9** se muestran en las **Tablas 4.2** y **4.4** que presentan las antocianinas aciladas correspondientes.

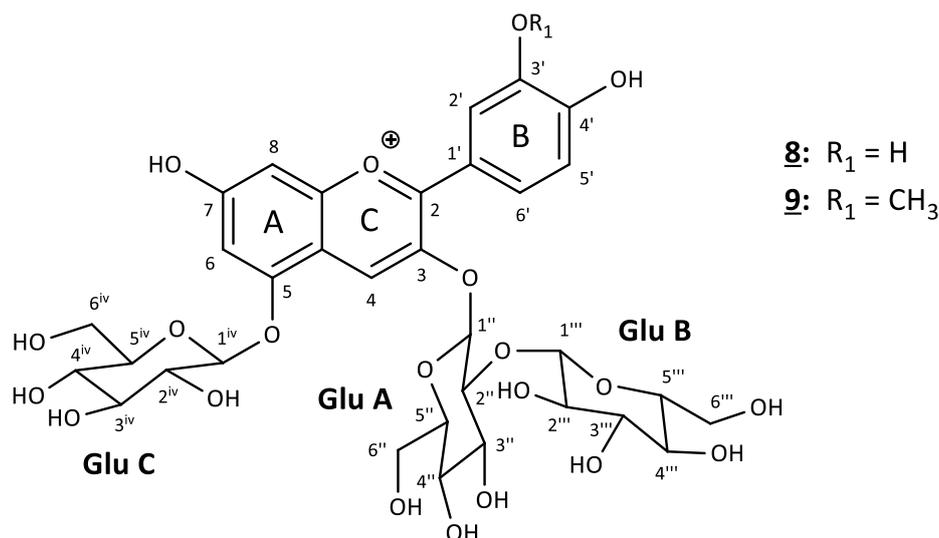


Figura 4.1. Estructuras químicas de las antocianinas desaciladas: **8**: Cianidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- β -*D*-glucósido. **9**: Peonidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- β -*D*-glucósido.

4.3.3. Datos espectroscópicos en común para las estructuras químicas de las antocianinas aciladas 1-7

Las absorciones IR a 3300, 1718 (hombro), 1685 y 1641 cm^{-1} indicaron la presencia de funcionalidades hidroxilo, carbonilo y enona α,β -insaturada respectivamente, en las antocianinas **1-7**.

En los espectros UV-Vis, las absorciones en la región 319-327 nm de **1-7** también respaldaron la presencia de residuos de cafeoilo y/o *p*-cumaroilo. Se identificaron dos grupos acilo para **1-5** y uno para **6 y 7** en base a los valores de $E_{\text{acilo.máx}}/E_{\text{vis.máx}}$ (absorbancia a $\lambda_{\text{acilo.máx}}$ /absorbancia a $\lambda_{\text{vis.máx}}$). Como se esperaba, todos los máximos de absorción ($\lambda_{\text{vis.máx}}$) de **1-6** mostraron desplazamientos batocrómicos con AlCl_3 debido a que son antocianinas basadas en cianidina con la subestructura de catecol en el anillo B. En cambio, la antocianina **7** no mostró este desplazamiento debido a la presencia de peonidina, la cual carece de la subestructura de catecol en el anillo B.

Los pesos moleculares de estos pigmentos se determinaron mediante espectrometría de masa con ionización suave (FAB). Todos estos hallazgos indicaron que las antocianinas aciladas de *Ipomoea cairica* eran derivados de: en **1**: cafeoilo y glucosilcafeoilo, en **2 y 3**: cafeoil-*p*-cumaroilo, en **4 y 5**: di-cafeoilo y en **6**: mono-cafeoilo de cianidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- β -*D*-glucósido. En cambio, **7** resultó ser un mono-cafeoilderivado de peonidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- β -*D*-glucósido.

Las estructuras completas de **1-7** se establecieron mediante análisis de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y experimentos de 2D-RMN, como la espectroscopía de correlación de filtrado cuántico doble homonuclear (DQF-COSY, *homonuclear double quantum filtered correlation spectroscopy*), la espectroscopía nuclear de Overhauser y de intercambio (NOESY) y la técnica de espectroscopía de correlación de enlaces múltiples heteronucleares (HMBC). Se asignaron las señales de ^{13}C y ^1H . Las señales de ^1H a campos magnéticos bajos (δ_{H} 6–9 ppm) mostraron señales características de la aglicona y de los grupos cafeoilo y *p*-cumaroilo.

Las antocianinas **1-6** tienen cianidina como aglicona, apareciendo las señales correspondientes del núcleo de benzopirilio y el anillo B aromático 1,3,4-trisustituido; en cambio **7** mostró la presencia de peonidina con la señal intensa característica del grupo metoxilo, tanto en $^1\text{H-RMN}$ (δ_{H} 3,93). como en $^{13}\text{C-RMN}$ (δ_{C} 56,6). La presencia de la unidad (*E*)-cafeóilo en los espectros **1-7**, y además, el residuo (*E*)-*p*-cumaroílo en los espectros de **3** y de **4**, se confirmó con los bencenos 1,3,4-trisustituidos y 1,4-disustituidos y las constantes de acoplamiento grandes ($J_{\alpha,\beta} \approx 16$ Hz) para las señales de protones (*E*)-olefínicos. Por lo tanto, todos los grupos acilo mostraron configuración *E*.

En base a los desplazamientos químicos, así como en las constantes de acoplamiento, de las señales de protones en las unidades de azúcar de los compuestos **1-7**, todas las unidades de glucosa estaban en la forma β -*D*-glucopiranosido. Además, el H-2" de Glc-A (δ_{H} 3,93–4,07) y el C-2" de Glc-A (δ_{C} 81,0–83,9) se desplazaron claramente a campos bajos más que el H-2"' de Glc-B (δ_{H} 2,93–3,69) y el C-2"' de Glc-B (δ_{C} 74,6–78,4) o el H-2^{iv} de Glc-C (δ_{H} 3,48–3,80) y el C-2^{iv} de Glc-C (δ_{C} 73,3–75,5). Por lo tanto, el protón anomérico H-1'" de Glc-B estaba unido al HO-2" de Glc-A. Los espectros NOESY y HMBC proporcionaron datos directos sobre la presencia del enlace β -*D*-Glc-B(1→2)Glc-A del soforósido.

La conexión entre una aglicona, los azúcares (tres unidades para **2-7**; cuatro unidades para **1**) y los grupos acilo en los compuestos **1-7** se confirmó mediante las mediciones NOESY y HMBC. En los espectros NOESY de **1-6**, tres señales NOE intensas entre H-4 de cianidina y H-1" de Glc-A; H-2" de Glc-A y H-1"' de Glc-B; y H-6 de cianidina y H-1^{iv} de Glc-C indicaron que Glc-A, Glc-B y Glc-C estaban unidas a través de enlaces glicosídicos al HO-3 de cianidina, HO-2" de Glc-A y HO-5 de cianidina respectivamente. En los espectros HMBC de los compuestos **1-6**, los claros picos cruzados de $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ entre H-1" de Glc-A y C-3 de cianidina; H-1"' de Glc-B y C-2" de Glc-A; H-2" de Glc-A y C-1"' de Glc-B; y H-1^{iv} de Glc-C y C-5 de cianidina, respaldaron aún más las uniones de Glc-A al HO-3 de cianidina, Glc-B al HO-2" de Glc-A, y Glc-C al HO-5 de cianidina respectivamente. Lo mismo para **7**, pero con peonidina en lugar de cianidina.

Los picos de correlación de Glc-A y las señales de carbono carbonílico del acilo de los compuestos **1-6** mostraron la presencia de un grupo acilo unido a HO-6 de Glc-A en todos los compuestos.

La correlación distintiva entre las señales de H-6"' de Glc-B y el carbono carbonílico del acilo (aproximadamente δ_{C} 166,5) proporcionó una prueba decisiva de que el segundo grupo acilo estaba unido al HO-6"' de Glc-B para los compuestos **2** y **4**. Sin embargo, los compuestos **3** y **5** mostraron picos de correlación entre H-2"' de Glc-B y las señales de carbono acil-carbonilo indicando que el segundo grupo acilo estaba unido al HO-2"' de Glc-B.

4.3.3.1. Antocianina acilada **1**

El espectro de masa FAB de la antocianina **1** dio un ion molecular $[\text{M}]^+$ 1259, correspondiente a $\text{C}_{57}\text{H}_{63}\text{O}_{32}$ (1259,297) y un fragmento 1097 $[\text{M} - 162]^+$. La estructura de **1** se determinó principalmente mediante el análisis de los espectros de $^1\text{H-}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ (**Tabla 4.2**). El espectro $^1\text{H-RMN}$ del compuesto **1** mostró la presencia de una molécula de cianidina, dos grupos cafeóilo y cuatro unidades de glucosa, todas las cuales estaban en la

forma β -D-glucopiranososa de acuerdo con las constantes de acoplamiento *vicinal* ($J=7,3-10,0$ Hz) (Lobayan *et al.*, 2024). Mediante el análisis de su espectro ^1H - ^1H COSY, se asignaron seis protones de cianidina y 10 protones de los grupos cafeoilo **I** y **II** (Tabla 4.2). Los cuatro protones característicos, desplazados a campos bajos a δ_{H} 4,33, 4,40 (Glc-A) y δ_{H} 3,83, 3,95 (Glc-B), se asignaron a los dos metilenos de C-6'' y C-6''' de las respectivas unidades de glucosa A y B. El H-1'' anomérico (δ_{H} 5,69; $d, J=7,3$ Hz) de Glc-A se correlacionó con los H-6'' a y b (δ_{H} 4,33 y 4,40), y también el H-1''' (δ_{H} 4,81; $d, J=7,7$ Hz) de Glc-B se correlacionó con los H-6''' a y b (δ_{H} 3,83 y 3,95) mediante el análisis del espectro ^1H - ^1H COSY. Por lo tanto, ambas unidades de glucosa estaban aciladas con los grupos cafeoilo I y II respectivamente. Como se mencionó, los picos de correlación de las señales de Glc-A y del carbono carbonílico del cafeoilo demostraron que un cafeoilo estaba unido al HO-6'' de Glc-A y el segundo al HO-6''' de Glc-B. La cuarta unidad de glucosa, Glc-D, estaba unida al HO-3 del cafeoilo II a través de un enlace glicosídico debido a la intensa señal NOE entre el H-2 del cafeoilo II y el H-1^v de Glc-D.

Tabla 4.2. Datos espectroscópicos de ^1H - y ^{13}C -RMN para las antocianinas aciladas **1**, **2** y **4** y de la antocianina desacilada cianidina-3-O-soforósido-5-O-glucopiranosido **8** [$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ -DMSO- d_6 (1:9) a 25°; TMS estándar interno].

Posición	Antocianina acilada 1		Antocianina desacilada 8		Antocianina acilada 2		Antocianina acilada 4	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
Aglicona:	Cianidina		Cianidina		Cianidina		Cianidina	
2	-	162,3	-	162,6	-	164,8	-	165,0
3	-	145,6	-	144,5	-	145,0	-	145,0
4	8,80 <i>s</i>	132,8	8,94 <i>s</i>	134,0	8,85 <i>s</i>	139,0	8,81 <i>s</i>	138,7
5	-	155,2	-	155,3	-	156,7	-	156,9
6	6,98 <i>d</i> (1,2)	105,0	7,04 <i>d</i> (1,9)	104,3	6,86 <i>d</i> (1,8)	105,6	6,92 <i>d</i> (1,8)	105,6
7	-	167,8	-	168,1	-	170,0	-	170,0
8	6,95 (<i>br s</i>) <i>d</i> (1,2)	96,3	6,98 <i>d</i> (1,9)	96,3	6,84 <i>d</i> (1,8)	97,6	6,95 (<i>br s</i>) <i>d</i> (1,8)	97,6
9 (8 a)	-	155,2	-	155,3	-	157,1	-	156,6
10 (4 a)	-	111,7	-	111,7	-	113,0	-	113,0
1'	-	121,4	-	119,7	-	120,7	-	120,0
2'	8,05 <i>d</i> (2,1)	117,7	8,06 <i>d</i> (2,2)	117,7	7,92 <i>d</i> (1,8)	118,5	8,05 <i>d</i> (2,2)	118,6
3'	-	146,3	-	146,5	-	147,4	-	147,3
4'	-	155,2	-	155,5	-	156,4	-	156,3
5'	7,11 <i>d</i> (8,5)	117,1	7,13 <i>d</i> (8,8)	117,2	7,00 <i>d</i> (8,4)	117,5	7,11 <i>d</i> (8,5)	117,5
6'	8,25 <i>dd</i> (2,1; 8,5)	127,5	8,32 <i>dd</i> (2,2; 8,8)	128,0	8,22 <i>dd</i> (1,8; 8,4)	129,2	8,26 <i>dd</i> (2,2; 8,8)	129,1

Glucosa A								
1"	5,69 <i>d</i> (7,3)	99,3	5,62 <i>d</i> (7,0)	99,8	5,32 <i>d</i> (7,2)	102,9	5,68 <i>d</i> (7,4)	102,9
2"	4,07 <i>dd</i> (6,9; 8,5)	81,8	4,08 <i>t</i> (8,0)	81,2	3,98 <i>dd</i> (7,2; 9,0)	83,9	4,07 <i>dd</i> (7,4; 9,0)	83,7
3"	3,75 <i>t</i> (8,5)	74,1	3,69 <i>t</i> (9,0)	76,1	3,78 <i>t</i> (9,0)	75,9	3,75 <i>t</i> (9,0)	76,0
4"	3,47 <i>t</i> (8,5)	69,3	3,42 <i>t</i> (9,0)	69,7	3,59 <i>dd</i> (9,0; 9,6)	71,2	3,49 <i>dd</i> (9,0; 9,6)	71,1
5"	3,97 <i>m</i>	76,1	3,59 <i>m</i>	76,0	3,74 <i>m</i> (9,6; 5,4)	77,7	3,93 <i>m</i> (9,6; 5,5)	77,7
6" <i>a</i>	4,33 <i>dd</i> (6,5; 12,0)	63,1 (C-6)	3,77 <i>m</i>	60,7 (C-6)	4,43 <i>dd</i> (5,4; 12,0)	64,1 (C-6)	4,33 <i>dd</i> (5,5; 12,0)	64,1 (C-6)
6" <i>b</i>	4,40 <i>d</i> <i>ancho</i> (12,0)	-	3,79 <i>m</i>	-	4,10 <i>d</i> (12,0)	-	4,41 <i>d</i> (4,4)	-
Glucosa B								
1'''	4,81 <i>d</i> (7,7)	104,6	4,70 <i>d</i> (7,0)	103,9	4,79 <i>d</i> (8,4)	106,1	4,81 <i>d</i> (7,0)	106,0
2'''	3,13 <i>dd</i> (8,0; 9,1)	74,7	3,00 <i>t</i> (8,0)	74,6	3,50 <i>dd</i> (8,4; 9,6)	75,4	3,52 <i>dd</i> (7,0; 9,0)	75,3
3'''	3,25 <i>t</i> (9,1)	76,1	3,11 <i>t</i> (9,0)	76,3	3,44 <i>dd</i> (7,2; 9,6)	77,4	3,50 <i>dd</i> (9,0; 6,8)	77,3
4'''	3,35 <i>t</i> (9,1)	70,2	3,05 <i>t</i> (9,0)	69,3	3,46 <i>dd</i> (7,2; 6,6)	71,1	3,46 <i>dd</i> (6,8; 6,0)	71,2
5'''	3,55 <i>m</i>	77,7	2,70 <i>m</i>	77,5	3,52 <i>dd</i> (6,6; 3,4)	78,7	3,48 <i>dd</i> (6,0; 2,4)	78,6
6''' <i>a</i>	3,83 <i>dd</i> (5,9; 11,5)	65,0 (C-6)	3,19 <i>m</i>	60,6 (C-6)	4,24 <i>dd</i> (3,4; 12,0)	64,0 (C-6)	4,32 <i>dd</i> (2,4; 12,0) 3,58	63,9 (C-6)
6''' <i>b</i>	3,95 <i>d</i> <i>ancho</i> (11,5)	-	3,19 <i>m</i>	-	4,24 <i>d</i> (12,0)	-	4,28 <i>d</i> (12,0) 3,83	-
Glucosa C								
1 ^{iv}	5,05 <i>d</i> (7,7)	102,1	5,16 <i>d</i> (7,0)	101,5	5,12 <i>d</i> (7,8)	106,2	5,16 <i>d</i> (7,6)	102,4
2 ^{iv}	3,55 <i>dd</i> (7,7; 9,1)	73,3	3,52 <i>br t</i> (8,0)	73,2	3,76 <i>dd</i> (7,8; 9,0)	75,5	3,80 <i>dd</i> (7,6; 9,0)	74,5
3 ^{iv}	3,40 <i>t</i> (9,1)	76,1	3,41 <i>br t</i> (7,0)	76,6	3,61 <i>t</i> (9,0)	76,4	3,65 <i>t</i> (9,1)	76,0
4 ^{iv}	3,19 <i>t</i> (9,1)	69,9	3,32 <i>t</i> (9,0)	69,8	3,50 <i>dd</i> (9,0; 9,6)	71,4	3,53 <i>dd</i> (9,0; 9,6)	71,4
5 ^{iv}	3,39 <i>m</i>	77,3	3,39 <i>br t</i> (8,0)	77,6	3,57 <i>m</i> (9,6; 2,4)	77,8	3,70 <i>m</i> (9,6; 2,4)	77,8

6 ^{iva}	3,49 m	61,0 (C-6)	3,62 m	60,7 (C-6)	3,79 dd (2,4; 12,0)	62,5 (C-6)	3,73 dd (2,4; 12,0)	62,4 (C-6)
6 ^{ivb}	3,73 d ancho (11,3)	-	3,62 m	-	4,03 d (12,0)	-	3,96 d (12,0)	-
Glucosa D			-		-		-	
1 ^v	4,82 d (7,0)	102,1	-	-	-	-	-	-
2 ^v	3,40 dd (7,7; 9,1)	73,5	-	-	-	-	-	-
3 ^v	3,9-3,1	75,9	-	-	-	-	-	-
4 ^v		69,8	-	-	-	-	-	-
5 ^v		77,3	-	-	-	-	-	-
6 ^{va}		61,0	-	-	-	-	-	-
6 ^{vb}		-	-	-	-	-	-	-
Acilo (I):	(E)-Cafeoilo		-		(E)-Cafeoilo		(E)-Cafeoilo	
1	-	124,8	-	-	-	127,4		127,3
2	6,98 (br s) d (1,6)	115,3	-	-	6,63 d (1,8)	115,2	6,96 (br s) d (1,8)	115,2
3	-	145,4	-	-	-	146,4		146,4
4	-	148,4	-	-	-	149,6		149,5
5	6,76 d (8,1)	115,9	-	-	6,75 d (8,4)	116,5	6,72 d (8,4)	116,5
6	6,87 d (8,1)	124,2	-	-	6,68 dd (1,8; 8,4)	123,3	6,64 dd (8,4; 1,8)	123,4
Alpha	6,19 d (15,8)	115,3	-	-	5,96 d (16,0)	114,4	5,94 d (16,0)	114,4
Beta	7,32 d (15,8)	144,2	-	-	7,20 d (16,0)	147,1	7,18 d (16,0)	147,1
Carbonilo C=O	-	166,3	-	-	-	169,0	-	169,0
Acilo (II):	(E)-Cafeoilo		-		(E)-Cumaroilo		(E)-Cafeoilo	
1	-	125,8	-	-	-	126,4		127,0
2	7,36 br s	115,9	-	-	7,03 d (8,4)	130,9	6,60 d (1,8)	115,0
3	-	145,6	-	-	6,67 d (8,4)	116,8		146,4
4	-	149,6	-	-	-	161,0		149,3
5	6,84 d (8,1)	116,4	-	-	6,67 d (8,4)	116,8	6,61 d (8,4)	116,3
6	7,04 br d (8,1)	125,6	-	-	7,03 d (8,4)	130,9	6,50 dd (8,4; 1,8)	122,8

Alpha	6,12 <i>d</i> (15,8)	114,6	-	-	5,81 <i>d</i> (16,0)	114,3	5,75 <i>d</i> (16,0)	114,3
Beta	7,24 <i>d</i> (15,8)	144,8	-	-	7,10 <i>d</i> (16,0)	146,3	7,00 <i>d</i> (16,0)	146,6
Carbonilo C=O	-	166,6	-	-	-	168,7	-	168,6

Por lo tanto, el pigmento **1** se identificó como: **Cianidina-3-O-{2"-O-[6"-O-(3^{caf}-O-β-D-glucopiranosil)-(E)-cafeoil}-β-D-glucopiranosil]-6"-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosido}-5-O-β-D-glucopiranosido** (Figura 4.2). Esta antocianina acilada se identificó por primera vez en *Ipomoea cairica* (Pomilio & Sproviero, 1972a) sin establecer la unión completa de los grupos acilo, y luego en *I. purpurea* (Saito *et al.*, 1995).

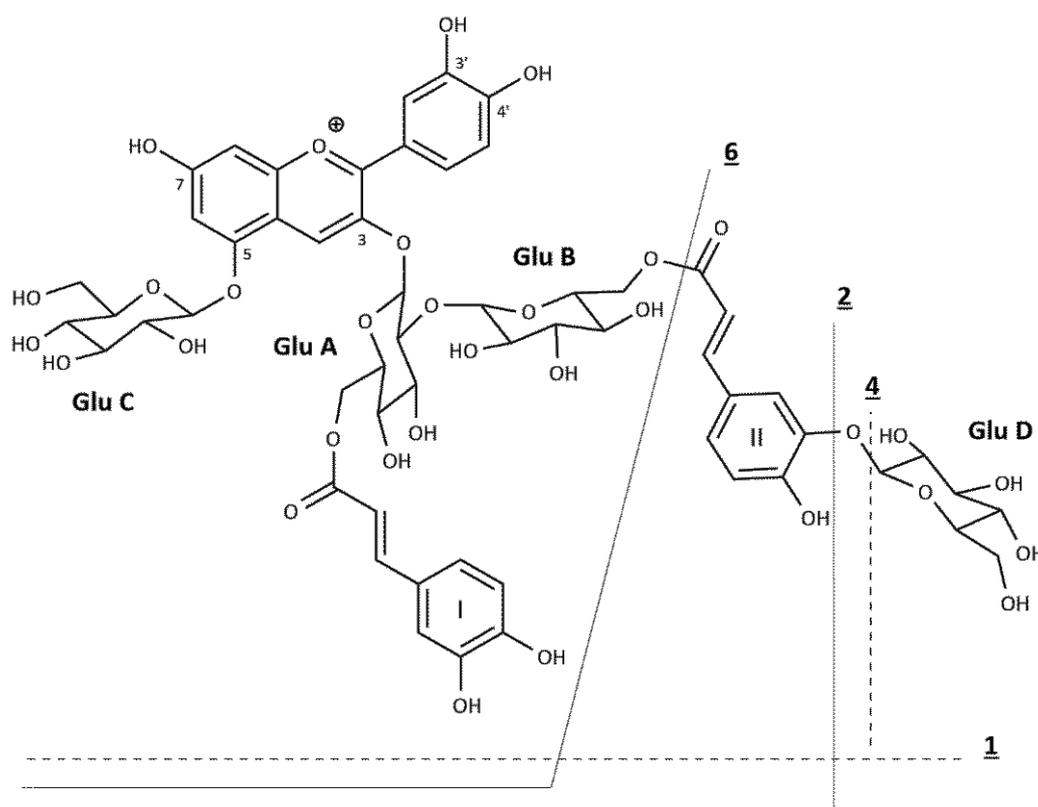


Figura 4.2. Antocianinas **1**, **2**, **4** y **6** de *Ipomoea cairica*.

4.3.3.2. Antocianina acilada **2**

La antocianina **2** contenía una función (*E*)-cafeoil y una función (*E*)-*p*-cumaroil, así como cianidina-3-*O*-β-*D*-soforósido-5-*O*-β-*D*-glucopiranosido. En el espectro HMBC de **2**, se observó el pico de correlación entre H-6" de Glc-A y la resonancia del carbono carbonílico del grupo cafeoil, lo cual indica la presencia de un grupo cafeoil unido al HO-6" de Glc-A. Además, el grupo *p*-cumaroil estaba unido al HO-6"' de Glc-B según el pico de correlación entre las señales del H-6"' de Glc-B y el carbono carbonílico del *p*-cumaroil.

Por lo tanto, la antocianina **2** se identificó inequívocamente como: **Cianidina-3-O-[2"-O-(6"-O-(E)-p-cumaroíl-β-D-glucopiranosil)-6"-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosido]-5-O-β-D-glucopiranosido (Figura 4.2)**, mediante análisis químicos y espectroscópicos.

La antocianina **2** ya se ha descrito en flores de *Ipomoea cairica* (Pomilio & Sproviero, 1972a), pero no se establecieron los sitios de unión exactos de los residuos de acilo, también en flores de *I. asarifolia* (Palé *et al.*, 1998) y flores y cultivos celulares de *Ajuga reptans* (Terahara *et al.*, 2001).

4.3.3.3. Antocianina acilada **4**

Los compuestos **2** y **4** proporcionaron espectros similares, pero el compuesto **4** contenía dos grupos cafeoil. En consecuencia, la estructura de **4** se estableció inequívocamente como: **Cianidina-3-O-[2"-O-(6"-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosil)-6"-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosido]-5-O-β-D-glucopiranosido (Figura 4.2)**. Esta antocianina acilada **4** se aisló por primera vez de *Ipomoea cairica* (Pomilio & Sproviero, 1972a) sin establecer la posición acilo; y más tarde de *I. purpurea* (Saito *et al.*, 1995) y de un callo altamente pigmentado inducido a partir de la raíz de almacenamiento de las batatas de pulpa morada [*I. batatas* (L) Lam.] cultivar Ayamurasaki (Terahara *et al.*, 2004). Se ha informado actividad antioxidante para esta antocianina acilada con dicafeoil (Meira *et al.*, 2012). Si bien no está claro que sea la misma antocianina debido a que existe confusión en la literatura respecto a la posición de acilación.

4.3.3.4. Antocianinas aciladas **3** y **5**

Los compuestos **3** y **5** mostraron espectros similares (**Tabla 4.3**), pero **3** produjo ácido cafeico y ácido *p*-cumárico tras la hidrólisis, mientras que **5** sólo produjo ácido cafeico. El desplazamiento químico (δ_H ca. 3,65 y 3,69) de H-2''' de Glc-B de **3** y **5** se desplazó hacia campos bajos en comparación con la misma señal (δ_H ca. 2,93-3,52) en las otras antocianinas **1**, **2**, **4**, **6** y **7**, lo que respalda que HO-2''' de Glc-B está acilado en ambos casos (**3** y **2**). La correlación distintiva entre las señales de H-6'' de Glc-A y el carbono carbonílico del cafeoil demostró que tanto **3** como **5** presentan un grupo cafeoil unido al HO-6'' de Glc-A. Sin embargo, el compuesto **3** mostró un pico de correlación entre H-2''' de Glc-B y la señal del carbono carbonílico de *p*-cumaroil, indicando que el grupo *p*-cumaroil es el acilo en el HO-2''' de Glc-B. El compuesto **5**, en cambio, mostró correlaciones HMBC del carbono carbonílico del grupo cafeoil en el H-2''' de Glc-B.

Por lo tanto, el compuesto **3** se identificó inequívocamente como: **Cianidina-3-O-(2"-O-[2'''-O-(E)-p-cumaroíl-β-D-glucopiranosil)-6"-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosido]-5-O-β-D-glucopiranosido** y el compuesto **5** se identificó como: **Cianidina-3-O-[2"-O-(2'''-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosil)-6"-O-(E)-cafeoil-β-D-glucopiranosido]-5-O-β-D-glucopiranosido (Figura 4.3)**. Estas antocianinas aciladas se describen por primera vez en esta Tesis.

Tabla 4.3. Datos espectroscópicos de ¹H- y ¹³C-RMN para las antocianinas aciladas **3** y **5** [CF₃CO₂DMSO-d₆ (1:9) a 25°; TMS estándar interno].

Posición	Antocianina acilada 3		Antocianina acilada 5	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
Aglicona:	Cianidina		Cianidina	
2	-	162,8	-	165,0
3	-	145,0	-	145,0
4	8,88 s	132,6	8,82 s	138,7
5	-	156,2	-	156,8
6	6,96 d (1,9)	105,3	6,92 d (1,8)	105,6
7	-	168,7	-	168,9
8	6,93 d (1,9)	97,3	6,95 (br s) d (1,8)	97,3
9 (8 a)	-	156,5	-	156,6
10 (4 a)	-	112,5	-	112,8
1'	-	120,2	-	120,0
2'	8,02 d (2,0)	117,8	8,05 d (2,1)	118,1
3'	-	146,8	-	147,1
4'	-	155,8	-	155,9
5'	7,10 d (8,8)	117,4	7,09 d (8,8)	117,5
6'	8,26 dd (2,0; 8,8)	129,1	8,26 dd (2,1; 8,8)	129,0
Glucosa A				
1''	5,62 d (7,2)	102,9	5,68 d (7,4)	102,9
2''	4,02 dd (7,2; 9,0)	83,9	4,07 dd (7,4; 9,0)	83,7
3''	3,77 t (9,0)	75,7	3,75 t (9,0)	75,8
4''	3,45 dd (9,0; 9,6)	71,2	3,49 dd (9,0; 9,6)	71,1
5''	3,72 m (9,6; 5,4)	77,7	3,93 m (9,6; 5,5)	77,7
6''a	4,43 dd (5,4; 12,0)	64,1 (C-6'')	4,33 dd (5,5; 12,0)	64,1 (C-6'')
6''b	4,30 d (12,0)	-	4,39 d (4,4)	-
Glucosa B				
1'''	4,78 d (8,4)	104,6	4,82 d (7,0)	105,8
2'''	3,65 dd (8,4; 9,6)	78,4	3,69 dd (7,0; 9,0)	78,3
3'''	3,38 dd (7,2; 9,6)	76,4	3,40 dd (9,0; 6,8)	77,1
4'''	3,16 dd (7,2; 6,6)	71,1	3,18 dd (6,8; 6,0)	71,2
5'''	3,22 dd (6,6; 3,4)	78,0	3,28 dd (6,0; 2,4)	78,6
6'''a	3,18 dd (3,4; 12,0)	60,8 (C-6''')	3,22 dd (2,4; 12,0)	60,9 (C-6''')
6'''b	3,18 d (12,0)	-	3,26 d (12,0)	-
Glucosa C				

<i>1^{iv}</i>	5,12 <i>d</i> (7,8)	106,2	5,16 <i>d</i> (7,6)	102,4
<i>2^{iv}</i>	3,76 <i>dd</i> (7,8; 9,0)	75,5	3,80 <i>dd</i> (7,6; 9,0)	74,5
<i>3^{iv}</i>	3,61 <i>t</i> (9,0)	76,4	3,65 <i>t</i> (9,1)	76,0
<i>4^{iv}</i>	3,50 <i>dd</i> (9,0; 9,6)	71,4	3,53 <i>dd</i> (9,0; 9,6)	71,4
<i>5^{iv}</i>	3,57 <i>m</i> (9,6; 2,4)	77,8	3,70 <i>m</i> (9,6; 2,4)	77,8
<i>6^{iv a}</i>	3,79 <i>dd</i> (2,4; 12,0)	62,5 (C-6 ^{iv})	3,73 <i>dd</i> (2,4; 12,0)	62,4 (C-6 ^{iv})
<i>6^{iv b}</i>	4,03 <i>d</i> (12,0)	-	3,96 <i>d</i> (12,0)	-
Acilo (I):	(E)-Cafeoílo		(E)-Cafeoílo	
<i>1</i>	-	127,4	-	127,3
<i>2</i>	6,62 <i>d</i> (1,8)	115,2	6,692 <i>d</i> (1,8)	115,2
<i>3</i>	-	146,4	-	146,4
<i>4</i>	-	149,6	-	149,5
<i>5</i>	6,73 <i>d</i> (8,4)	116,5	6,72 <i>d</i> (8,4)	116,5
<i>6</i>	6,68 <i>dd</i> (1,8; 8,4)	123,2	6,64 <i>dd</i> (8,4; 1,8)	123,4
<i>Alpha</i>	5,95 <i>d</i> (16,0)	114,4	5,95 <i>d</i> (16,0)	114,4
<i>Beta</i>	7,20 <i>d</i> (16,0)	147,1	7,20 <i>d</i> (16,0)	147,1
<i>Carbonilo C=O</i>	-	169,0	-	169,0
Acilo (II):	(E)-Cumaróilo		(E)-Cafeoílo	
<i>1</i>	-	126,5		127,0
<i>2</i>	7,03 <i>d</i> (8,4)	131,1	6,60 <i>d</i> (1,8)	115,0
<i>3</i>	6,67 <i>d</i> (8,4)	116,9		146,4
<i>4</i>	-	161,0		149,3
<i>5</i>	6,67 <i>d</i> (8,4)	116,9	6,61 <i>d</i> (8,4)	116,3
<i>6</i>	7,03 <i>d</i> (8,4)	131,1	6,50 <i>dd</i> (8,4; 1,8)	122,8
<i>Alpha</i>	5,80 <i>d</i> (16,0)	114,3	5,75 <i>d</i> (16,0)	114,3
<i>Beta</i>	7,11 <i>d</i> (16,0)	146,3	7,00 <i>d</i> (16,0)	146,6
<i>Carbonilo C=O</i>	-	168,9	-	168,8

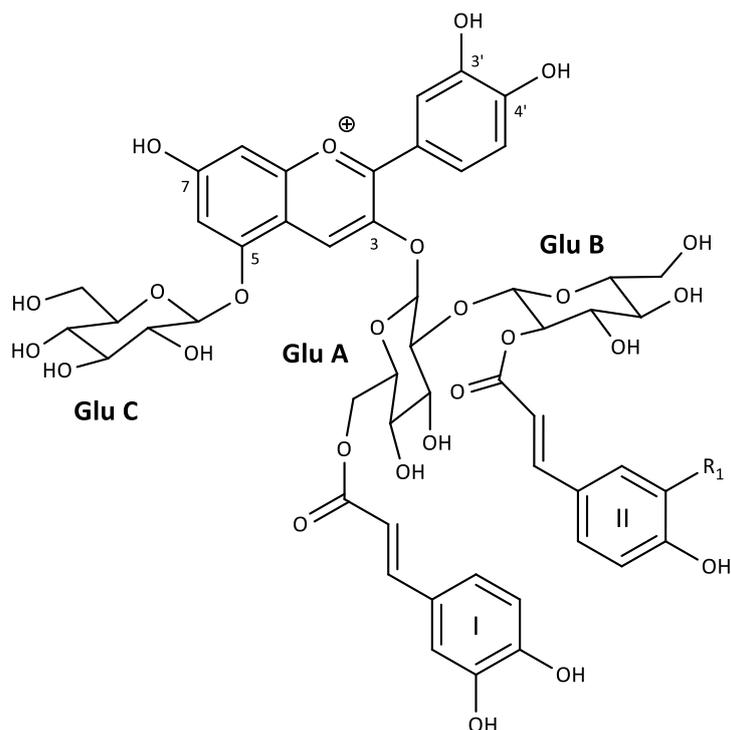


Figura 4.3. Antocianinas **3** y **5** de *Ipomoea cairica*. **3**: R₁ = H; **5**: R₁ = OH.

4.3.3.5. Antocianinas aciladas **6** y **7**

Las antocianinas **6** y **7** resultaron ser muy similares; ambas dieron por hidrólisis ácida sólo un cafeóilo como grupo acilo y glucosa como azúcar, pero diferente aglicona, **6** dio cianidina y **7** peonidina. Por el espectro HMBC se determinó que en ambas antocianinas. el acilo estaba unido al HO-6" de Glc-A

El análisis por espectrometría de masa de **6** mostró un ión molecular [M]⁺ = 935, correspondiente a C₄₂H₄₇O₂₄ y fragmentos de iones a *m/z* 773, 449 y 287, correspondientes a [M - cafeóilo + H]⁺, [M - cafeóildiglicosilo + H]⁺ y [Cn]⁺ respectivamente. El espectro de ¹H-RMN de **6** presentó señales de una unidad de cianidina, un grupo *E*-cafeóilo con una constante de acoplamiento grande (*J* = 15,8 Hz) y tres β-glucopiranosas con constantes de acoplamiento de protones anoméricos y otros protones del anillo con valores *J* de 7,6-9,1 Hz.

Las conexiones de las unidades de **6** se confirmaron mediante el espectro HMBC, en el cual se observó una correlación entre la señal del protón anomérico H-1" (δ_H 5,59) de la glucosa A y la señal de C-3 (δ_C 144,5) de cianidina, la señal del protón anomérico H-1^{iv} (δ_H 5,02) de la glucosa C y la señal de C-5 (δ_C 155,3) de cianidina, la señal del protón anomérico H-1" (δ_H 4,61) de la glucosa B y la señal de C-2" (δ_C 81,0) de la glucosa A, la señal de H-2" (δ_H 4,03) de la glucosa A y la señal de C-1" (δ_C 103,9) de la glucosa B, y las señales de H-6" a y b (δ_H 4,26 y δ_H 4,34) de la glucosa A y la señal del carbono carbonílico (δ_C 166,7) del grupo cafeóilo.

Por lo tanto, la antocianina **6** se identificó como: **Cianidina-3-O-[(2"-O-β-D-glucopiranosil)-6"-O-(*E*)-cafeóil-β-D-glucopiranosido]-5-O-β-D-glucopiranosido** (Figuras 4.2 y 4.4).

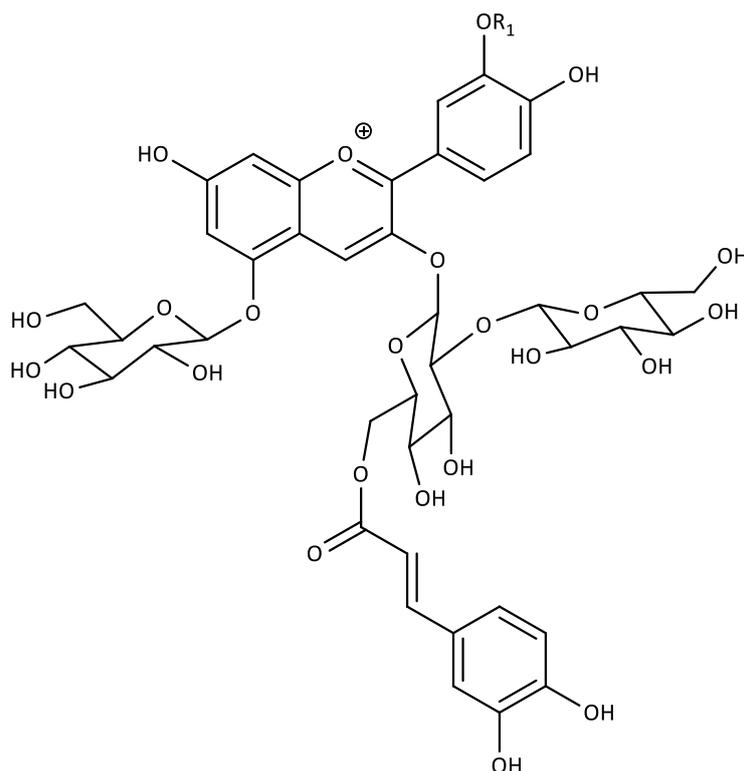


Figura 4.4. Estructuras químicas de las antocianinas aciladas **6**: $R_1 = H$ y **7**: $R_1 = CH_3$.

Esta antocianina acilada se informó en hojas de batatas (*I. batatas*) (Islam *et al.*, 2002), si bien no se describieron los detalles del análisis espectroscópico. Se ha informado la actividad antioxidante y la actividad antimutagénica de esta antocianina acilada monocateoílada (Yoshimoto *et al.*, 2001; Meira *et al.*, 2012), quedando la duda si es la misma.

La antocianina acilada **7** que resultó casi idéntica a **6**, tenía como diferencia la presencia de peonidna como aglicona. El espectro de masa de **7** mostró un ion molecular $[M]^+ = 949$, correspondiente a $C_{43}H_{49}O_{24}^+$ y $[M - \text{cafeoil} + H]^+$ a m/z 787, $[M - \text{cafeoil} + H]^+$ a m/z 463 y $[Pn]^+$ a m/z 301.

Los datos de 1H -RMN y de ^{13}C -RMN de **7** fueron muy similares a los de **6** excepto por las señales debidas a la aglicona peonidina (**Tabla 4.4**). La conexión entre las unidades de **7** se confirmó mediante la comparación de los datos de ^{13}C -RMN de **7** con los de **6**. La asignación de las señales y la posición de los enlaces de **6** y **7** se confirmaron inequívocamente mediante análisis DQF-COSY y HMBC y los datos espectroscópicos mostraron que **7** es un análogo de **6** (**Tabla 4.4**).

Por lo tanto, se determinó la estructura de **7** como: **Peonidina-3-O-[(2''-O- β -D-glucopiranosil)-6''-O-(E)-cafeoil- β -D-glucopiranosido]-5-O- β -D-glucopiranosido** (**Figura 4.4**).

Tabla 4.4. Datos espectroscópicos de ^1H - y ^{13}C -RMN para las antocianinas aciladas **6** y **7** y la antocianina desacilada **9** [$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ -DMSO- d_6 (1:9) a 25°; TMS estándar interno].

Posición	Antocianina acilada 6		Antocianina acilada 7		Antocianina desacilada 9	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
Aglicona:	Cianidina		Peonidina		Peonidina	
2		162,6		162,8		162,7
3		144,5		145,1		145,1
4	8,69 s	131,7	8,88 s	136,5	8,88 s	136,5
5		155,3		156,2 ó 156,3		156,2 ó 156,3
6	6,92 d (1,9)	105,0	6,95 d (1,2)	105,6	6,95 d (1,2)	105,6
7		167,5		169,2		169,2
8	6,95 d (1,9)	96,3	7,08 d (1,2)	97,3	7,08 d (1,2)	97,3
9 (u 8 a)		155,1		156,2 ó 156,3	-	156,2 ó 156,3
10 (o 4 a)		111,8		112,0	-	112,0
1'		119,7		121,0		121,0
2'	7,97 d (2,4)	117,9	7,96 d (2,0)	114,2	7,96 d (2,0)	114,2
3'	-	146,4		149,1	-	149,1
4'	-	155,2		156,6	-	156,6
5'	7,01 d (8,8)	117,1	7,06 d (8,7)	117,2	7,06 d (8,7)	117,2
6'	8,17 dd (2,4; 8,8)	127,7	8,31 dd (2,0; 8,7)	131,9	8,31 dd (2,0; 8,7)	131,9
OMe	-	-	3,93 s	56,6	3,93 s	56,6
Glucosa A						
1''	5,59 d (7,6)	99,3	5,63 d (6,9)	99,5	5,63 d (6,9)	99,5
2''	4,03 dd (7,6; 8,8)	81,0	3,93 dd (6,9; 8,5)	82,8	3,94 dd (6,9; 8,5)	82,8
3''	3,66 t (8,8)	76,1	3,67 t (8,5)	75,3	3,68 t (8,5)	75,3
4''	3,44 t (8,8)	69,8	3,45 t (8,5)	70,5	3,44 t (8,5)	70,5
5''	3,92 m	74,0	3,89 m	75,0	3,50 m	76,8
6''a	4,26 dd (6,5; 12,0)	63,1 (C- 6'')	4,24 dd (6,5; 12,0)	63,9 (C-6'')	3,75 dd (6,5; 12,0)	60,9 (C-6)
6''b	4,34 d ancho (12,0)	-	4,34 d ancho (12,0)	-	3,79 d ancho (12,0)	-
Glucosa B						
1'''	4,61 d (7,7)	103,9	4,59 d (8,0)	105,4	4,60 d (8,0)	105,4
2'''	2,93 dd (7,7; 8,9)	74,6	2,93 dd (8,0; 9,1)	75,1	2,95 dd (8,0; 9,1)	75,1
3'''	3,05 t (8,9)	76,3	3,04 t (9,1)	77,0	3,06 t (9,1)	77,0

4 ^{'''}	2,98 t (8,9)	69,8	2,93 t (9,1)	70,5	2,93 t (9,1)	70,5
5 ^{'''}	2,67 m	76,9	2,74 m	77,2	2,74 m	77,2
6 ^{'''a}	3,12 dd (5,1; 11,7)	60,7 (C- 6 ^{'''})	3,15 dd (5,9; 11,5)	61,7 (C- 6 ^{'''})	3,14 dd (5,9; 11,5)	61,7 (C- 6 ^{'''})
6 ^{'''b}	3,09 d ancho (11,7)	-	3,28 d ancho (11,5)	-	3,26 d ancho (11,5)	-
Glucosa C						
1 ^{iv}	5,02 d 7,6	102,3	5,05 d (7,7)	102,6	5,03 d (7,7)	102,6
2 ^{iv}	3,48 dd (7,6, 9,1)	73,4	3,48 dd (7,7; 9,1)	74,0	3,50 dd (7,7; 9,1)	74,0
3 ^{iv}	3,32 t (9,1)	76,2	3,33 t (9,1)	76,5	3,36 t (9,1)	76,5
4 ^{iv}	3,19 t (9,1)	70,0	3,20 t (9,1)	70,5	3,22 t (9,1)	70,5
5 ^{iv}	3,45 m	77,8	3,45 m	78,5	3,46 m	78,5
6 ^{iva}	3,49 dd (5,9; 11,7)	61,1 (C- 6 ^{iv})	3,49 m	61,7 (C- 6 ^{iv})	3,48 m	61,7 (C- 6 ^{iv})
6 ^{ivb}	3,74 dd (2,4; 11,7)	-	3,73 d ancho (11,3)	-	3,73 d ancho (11,3)	-
Acilo (I):	Cafeoilo		Cafeoilo		-	
1	-	125,6	-	126,5	-	-
2	6,89 d (2,0)	115,4	6,88 d (1,6)	115,8	-	-
3	-	145,5	-	146,2	-	-
4	-	148,5	-	149,1	-	-
5	6,68 d (8,1)	116,0	6,68 d (8,0)	116,6	-	-
6	6,79 dd (2,0; 8,1)	121,5	6,78 dd (1,6; 8,0)	122,4	-	-
Alpha	6,12 d (15,8)	113,8	6,08 d (15,8)	114,5	-	-
Beta	7,25 d (15,8)	145,7	7,24 d (15,8)	146,2	-	-
Carbonilo C=O	-	166,7	-	166,1	-	-

4.4. Estabilidad de las antocianinas aciladas obtenidas en esta Tesis

Dada la importancia de las antocianinas en su aplicación en alimentos funcionales y nutracéuticos en beneficio para la salud y en su uso como colorantes alimentarios, procedimos al estudio de la estabilidad de los compuestos obtenidos y a su comparación con las antocianinas desaciladas correspondientes.

El estudio de estabilidad se realizó en solución acuosa neutra, en baño termostático a 25°C, usando el método de vida media ($t_{1/2}$), definido como el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de color residual. Las antocianinas diaciladas **1** a **5** mostraron una vida

media similar (**1** = **4** = $t_{1/2}$ = 230 minutos; **2** = 270 minutos; **3** = 250 minutos; **5** = 200 minutos), mayor que la vida media de las antocianinas monoaciladas (**6** $t_{1/2}$ = 40 minutos; **7** = 50 minutos) y que las no aciladas (**8** = $t_{1/2}$ = 16 minutos; **9** $t_{1/2}$ = 20 minutos) (**Figura 4.5**). Evidentemente las estructuras son relevantes en la estabilidad de las antocianinas obtenidas, observándose que la presencia de dos acilos brinda mayor estabilidad debido a la protección de la aglicona por estos acilos aromáticos que producen un stacking hidrofóbico tipo sándwich (complejo π) e inhiben el ataque de una molécula de agua que conduce a una pérdida de color (Brouillard, 1983; Goto & Kondo, 1991)

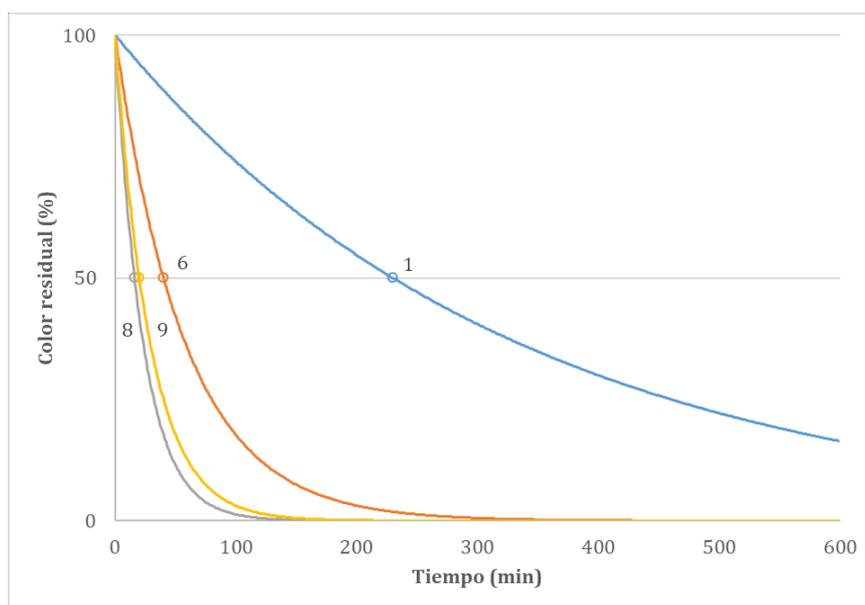


Figura 4.5. Estabilidad de las antocianinas **1-9** obtenidas de *Ipomoea cairica*, por el método de vida media, en solución acuosa neutra a temperatura ambiente. Se ejemplifica con: **1**: Antocianina diacilada con dos grupos cafeoilo. **6**: Antocianina monoacilada con cafeoilo. **8**: Antocianina no acilada, cianidina-3-*O*-soforósido-5-*O*-glucósido y **9**: antocianina no acilada, peonidina-3-*O*-soforósido-5-*O*-glucósido.

Asimismo, se observan sutiles diferencias en la estabilidad según el tipo de aglicona, ya que las antocianinas basadas en cianidina muestran menos estabilidad que las basadas en peonidina. También influye el tipo de agente acilante, resultando ser ligeramente más estables las antocianinas con grupos cumaróilo que las aciladas con cafeoilo. En todos estos casos se observa que la presencia del grupo catecol, en el anillo B de las agliconas, así como en el acilo, da menor estabilidad posiblemente por las posibilidades de oxidación que ofrece dicha subestructura. En menor grado influye la posición de acilación, ya que las antocianinas aciladas en la posición 2 de la glucosa son algo menos estables que aquellas aciladas en la posición 6 de la glucosa. Este hecho parecería estar relacionado con la conformación que adopte la antocianina acilada y el grado de formación de complejos π .

4.4.1. Cinética de la degradación de las antocianinas 1-9

Se pudo estudiar la cinética de degradación de las antocianinas **1-9**, teniendo en cuenta los valores de vida media de cada antocianina, correspondientes a una cinética de primer orden.

$$\ln ([A]_t/[A]_0) = -k_1 \cdot t$$

Dónde: $[A]_0$ es la concentración del compuesto A en $t = 0$; $[A]_t$ es la concentración del compuesto A al tiempo t ; k_1 es la constante de velocidad de degradación de primer orden.

Usando $t_{1/2}$, se reordena a: $\ln (0,5 [A]_0/[A]_0) = \ln 0,5 = -k_1 \cdot t_{1/2}$

$$k_1 \cdot t_{1/2} = \ln 2 = 0,693 \text{ o sea: } \boxed{k_1 = 0,693 / t_{1/2}}$$

Antocianinas diaciladas ($t_{1/2}$):

1 = 230 minutos = 13.800 segundos. $k_1 = 0,693/13.800 = 5,0224 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$

2 = 270 minutos = 16.200 segundos. $k_1 = 0,693/16.200 = 4,2784 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$

3 = 250 minutos = 15.000 segundos. $k_1 = 0,693/15.000 = 4,6207 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$

4 = 230 minutos = 13.800 segundos. $k_1 = 0,693/13.800 = 5,0224 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$

5 = 200 minutos = 12.000 segundos. $k_1 = 0,693/12.000 = 5,7758 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$

Antocianinas monoaciladas ($t_{1/2}$):

6 = 40 minutos = 2.400 segundos. $k_1 = 0,693/2.400 = 2,8880 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$

7 = 50 minutos = 3.000 segundos. $k_1 = 0,693/3.000 = 2,3103 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$

Antocianinas no aciladas ($t_{1/2}$):

8 = 16 minutos = 960 segundos. $k_1 = 0,693/960 = 7,2198 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$

9 = 20 minutos = 1.200 segundos. $k_1 = 0,693/1.200 = 5,7758 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$

4.4.2. Actividad antioxidante de las antocianinas 1-9: Ensayo de actividad de captación de radicales DPPH*

La actividad antioxidante de las antocianinas **1-9** fue evaluada como capacidad atrapante de radicales frente al radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH*). Se ensayó la actividad de las antocianinas aciladas **1-7** según el método colorimétrico DPPH* desarrollado previamente (Yamaguchi *et al.*, 1998) y se comparó con las antocianinas desaciladas **8** y **9**, y α -tocoferol como antioxidantes naturales y butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante sintético.

La absorbancia del DPPH* residual en la solución de muestra se midió a 520 nm. Las absorbancias inicial y en blanco se midieron sin sustrato y sin DPPH* respectivamente.

La actividad de captación de radicales DPPH* (CR%) se calculó como:

$$\text{CR}\% = 100(A_i - A_m + A_b) / A_i$$

Dónde: A_i , A_m y A_b fueron las absorbancias a 520 nm de las soluciones inicial, de muestra y en blanco respectivamente.

Los resultados mostraron una evidente actividad antioxidante en todos los compuestos ensayados. En todos los casos las antocianinas aciladas (**1-7**) resultaron más efectivas que las no aciladas (**8 y 9**). Las antocianinas diaciladas con dos grupos cafeoilo (**1, 4 y 5**) resultaron más activas que las diaciladas que contenían un grupo cumaroilo y un cafeoilo (**2 y 3**). Además, las antocianinas aciladas con dos grupos cafeoilos (**1, 4 y 5**) resultaron ser más activas que aquellas con un solo grupo cafeoilo (**6 y 7**) o con un cafeoilo y un cumaroilo (**2 y 3**). Las antocianinas aciladas con cianidina como aglicona presentaron una mayor actividad que aquellas basadas en peonidina. Este es el caso de la antocianina **6** monoacilada con cafeoilo y con cianidina como aglicona que resultó ser más activa que la antocianina cafeoilmonoacilada **7** que contenía peonidina como aglicona.

Estos resultados demuestran, primeramente, que la acilación con derivados hidroxilados del ácido cinámico mejora la actividad en comparación con las antocianinas no aciladas. Es decir que, la acilación podría lograr intramolecular y sinérgicamente la actividad de atrapar radicales de la aglicona además de la actividad propia de estos grupos acilo (Tamura y Yamagami, 1994).

Se conocen pocos estudios experimentales sobre la estabilidad de antocianinas y cuando los realizan, en general no utilizan la vida media, sino los valores finales correspondientes a la decoloración de las antocianinas (Saito *et al.*, 1995) o bien hay cálculos de vida media no concluyentes, sin determinar las constantes de primer orden (Terahara *et al.*, 2004).

En cambio, se han hecho varios estudios experimentales sobre la actividad antioxidante basada en el ensayo con radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (Terahara *et al.*, 2004).

4.5. Conclusiones del Capítulo 4

En este Capítulo se analizaron las antocianinas más complejas, como son las antocianinas aciladas con derivados del ácido cinámico. Se eligió el genero *Ipomoea*, y en particular, la especie *I. cairica* por haber demostrado en estudios previos de este laboratorio la presencia de este tipo de antocianinas (Pomilio & Sproviero, 1972a; Pomilio & Mercader, 2017).

Se pudo realizar la elucidación estructural de antocianinas aciladas muy similares, cuya estabilidad y bioactividad está modulada por pequeños cambios en su estructura. Esto muestra la necesidad de realizar un estudio estructural profundo de estos compuestos en todo el espacio conformacional, y debido a la falta de abordaje en este aspecto, se inició en esta Tesis con las agliconas más abundantes, como son pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina, como veremos a continuación. Estos resultados se vincularon con la actividad biológica antioxidante y antimutagénica de estos compuestos.

**Capítulo 5. Estudio y caracterización del espacio
conformacional de antocianidinas hidroxiladas y
metoxiladas**

5.1. Introducción a la exploración del espacio conformacional de las antocianidinas

En el contexto del estudio de moléculas bioactivas, las antocianidinas han suscitado un interés considerable debido a sus propiedades beneficiosas, como actividad antioxidante, antimutagénica y antiinflamatoria. Con el objetivo de simplificar y unificar la forma de referirse a estos compuestos, este Capítulo propone una nomenclatura estandarizada que permite identificar de manera clara y sencilla cada conformero, facilitando así la comunicación y el análisis en investigaciones futuras.

A partir de esta nomenclatura, se llevó a cabo un exhaustivo estudio del espacio conformacional de varias antocianidinas, abordando la búsqueda racional de conformeros mediante rotaciones periódicas de diferentes ángulos diedros, aprovechando la supuesta rigidez estructural de estos compuestos. Los espacios conformacionales fueron evaluados no sólo en vacío, sino también en tres solventes de diferente polaridad, lo que permitió una caracterización más completa de estos compuestos en distintos entornos biológicos.

5.2. ¿Por qué proponer una nomenclatura común?

Todas las antocianidinas comparten una estructura química común, compuesta por un esqueleto básico de ion flavilio, que incluye tres anillos: el anillo A, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo en la posición 5 y a un grupo hidroxilo o metoxilo en la posición 7; el anillo C, que es un anillo pirilio de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno; y el anillo B, un anillo aromático unido al anillo C en la posición 2 (**Figura 5.1**).

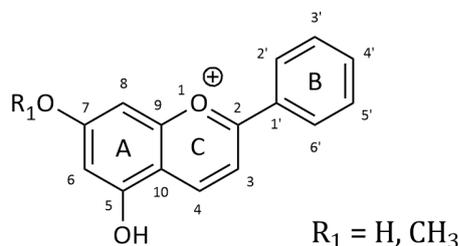


Figura 5.1. Estructura común de ion flavilio presente en todas las antocianidinas.

Las variaciones estructurales entre las diferentes antocianidinas se deben a los distintos sustituyentes, grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃), en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B y, en menor medida, en los anillos A y C. Todas las antocianidinas en estudio (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina) poseen grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5 y 7, distribuidos en los anillos A y C.

La nomenclatura propuesta en este Capítulo está diseñada para capturar tanto las características comunes como las variaciones específicas de las antocianidinas, permitiendo una descripción detallada de sus conformaciones. Esta nomenclatura toma en cuenta no sólo la estructura básica de ion flavilio y los sustituyentes en los anillos A, B y C, sino también las posibles rotaciones de los ángulos diedros que definen la conformación tridimensional de la molécula. Al estandarizar cómo se nombran y categorizan los diferentes conformeros, esta nomenclatura facilita la comunicación entre investigadores y

permite un análisis más riguroso y comparativo de los datos obtenidos en estudios conformacionales.

Con esta base, el Capítulo continúa explorando el espacio conformacional de las antocianidinas en diversos entornos, evaluando las variaciones en su estructura y la disposición de sus sustituyentes.

5.2.1. Nomenclatura propuesta

Los conformeros de las antocianidinas se clasificaron en dos categorías principales: *syn* (*cis*) y *anti* (*trans*), según la disposición de los enlaces H-O5 y H-O7 del anillo A, en relación con los enlaces C5-C6 y C6-C7 respectivamente. Así, los ángulos diedros H-O5-C5-C6 y H-O7-C7-C6 se aproximan a 0° para los arreglos *cis* (C) y a 180° para los *trans* (T) (Figura 5.2).

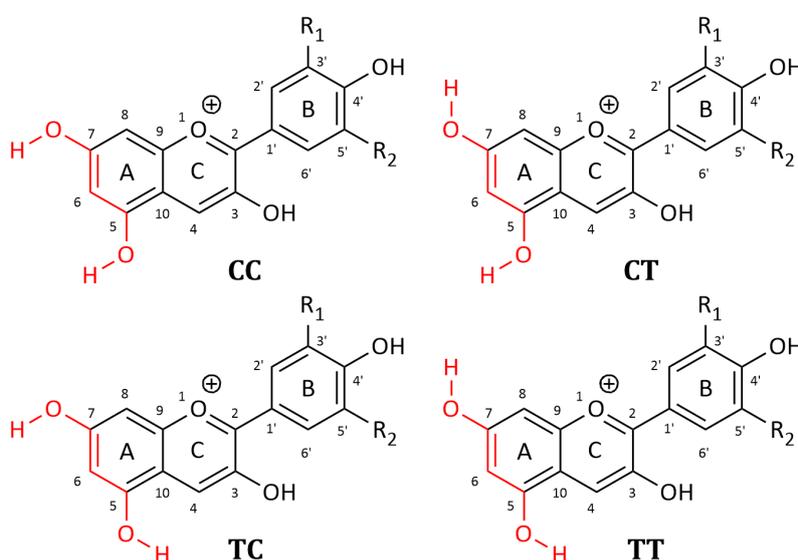


Figura 5.2. Estructuras CC, CT, TC y TT según los ángulos diedros H-O5-C5-C6 y H-O7-C7-C6 en el anillo A.

En el caso de pelargonidina (Pg), que tiene un solo grupo hidroxilo en el anillo B (HO-4'), se propusieron dos posibles arreglos espaciales, denominados **u** (arriba) y **d** (abajo), según la ubicación del enlace H4'-O4'. Un valor cercano a 180° para el ángulo diedro H-O4'-C4'-C3' definió la conformación **d**, mientras que un ángulo cercano a 0° correspondió a la conformación **u** (Figura 5.3).

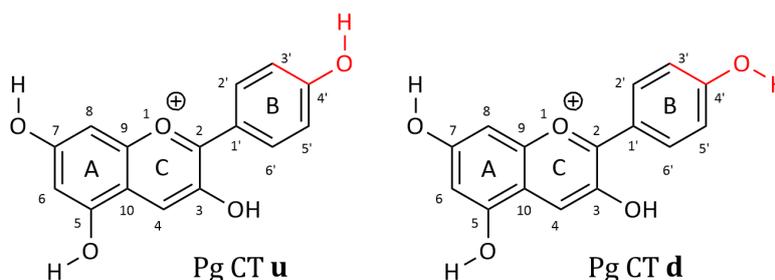


Figura 5.3. Estructuras **u** y **d** según el ángulo diedro H-O4'-C4'-C3' en el anillo B.

Para cianidina (Cn), que presenta dos grupos hidroxilo (HO-3' y HO-4') en el anillo B, se identificaron cuatro estructuras: **cc**, **ct**, **tc** y **tt**, dependiendo de la disposición de los enlaces H-03' y H-04' con respecto al enlace C3'-C4'. Estas disposiciones fueron nombradas siguiendo un criterio similar al utilizado para el anillo A, donde **c** (*cis*) y **t** (*trans*) describen ángulos diedros cercanos a 0° o 180° para H-03'-C3'-C4' y H-04'-C4'-C3' respectivamente (**Figura 5.4**).

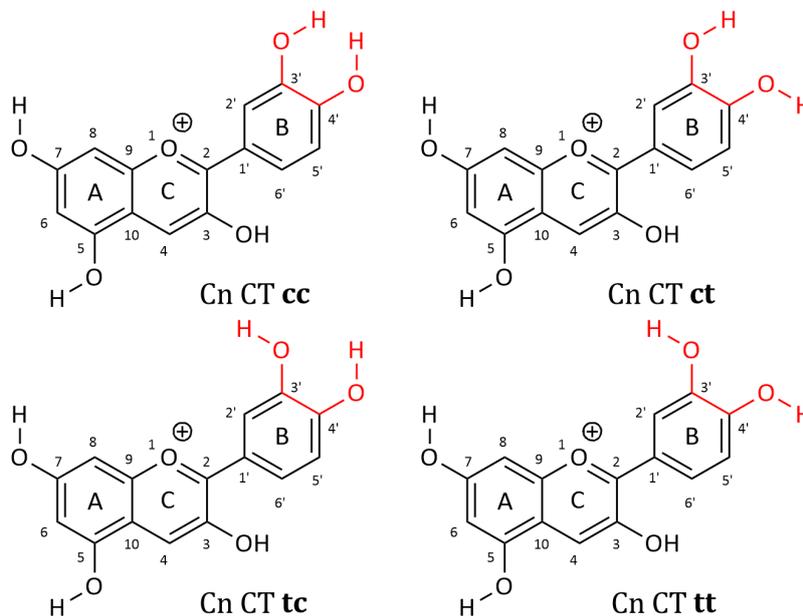
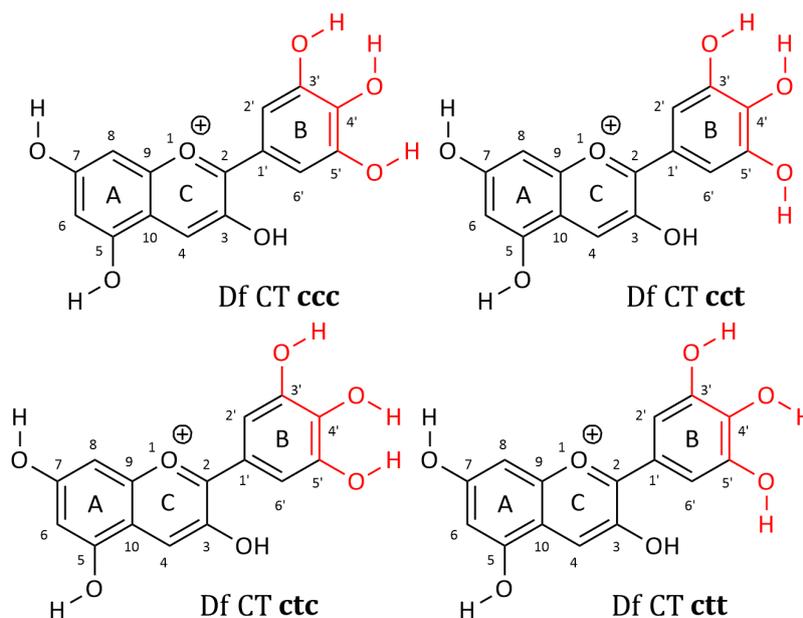


Figura 5.4. Estructuras **cc**, **ct**, **tc** y **tt** según los ángulos diedros H-03'-C3'-C4' y H-04'-C4'-C3' en el anillo B.

Delfinidina (Df), con tres grupos hidroxilo en el anillo B (HO-3', HO-4' y HO-5'), fue clasificada según la orientación del grupo HO-5' con respecto al enlace C4'-C5', utilizando un criterio análogo al de cianidina (**Figura 5.5**).



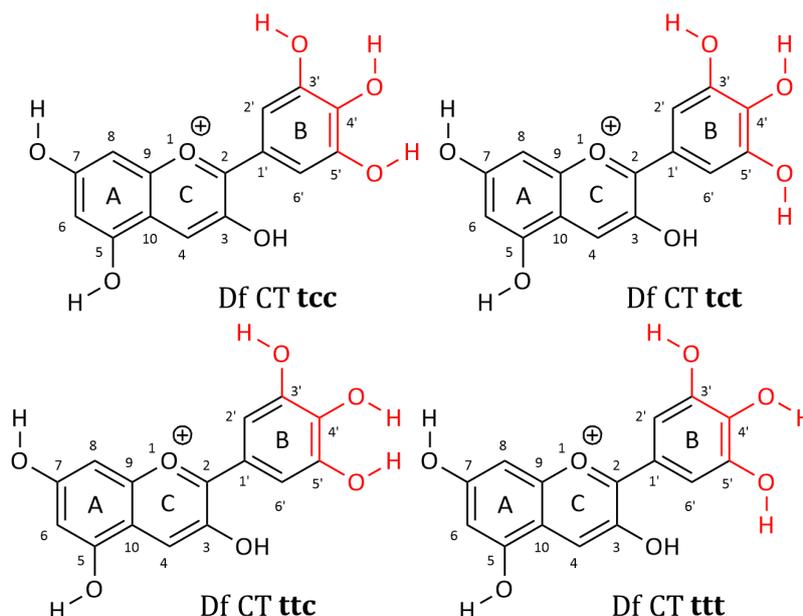


Figura 5.5. Estructuras **ccc**, **cct**, **ctc**, **ctt**, **tcc**, **tct**, **ttc** y **ttt** según los ángulos diedros H-03'-C3'-C4', H-04'-C4'-C3' y H-05'-C5'-C4' en el anillo B.

En el caso de peonidina (Pn), que posee un grupo hidroxilo (HO-4') y un grupo metoxilo (H₃CO-3'), se identificaron las estructuras **cc**, **ct**, **tc** y **tt**, dependiendo de la disposición de los enlaces H-04' y H₃C-03'. Aquí, los ángulos diedros H₃C-03'-C3'-C4' y H-04'-C4'-C3' cercanos a 0° o 180° se utilizaron para definir las conformaciones *cis* (**c**) y *trans* (**t**) (**Figura 5.6**).

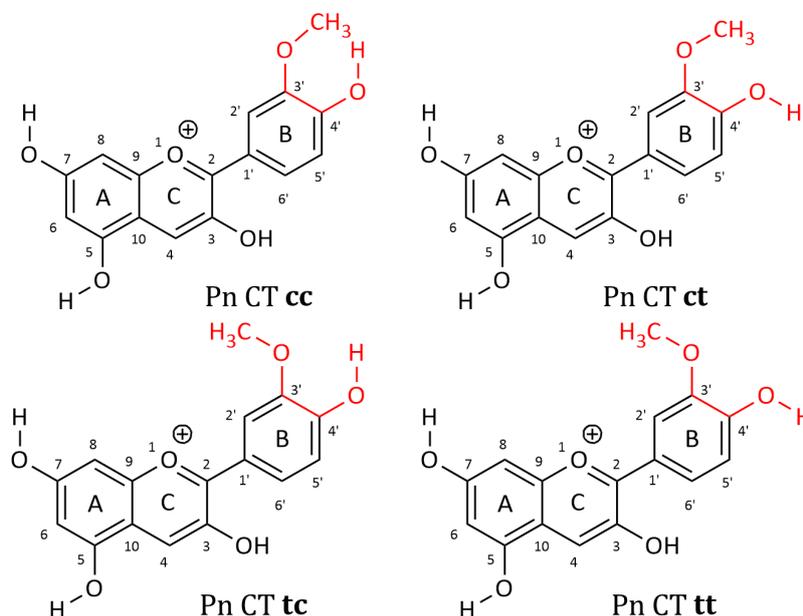


Figura 5.6. Estructuras **cc**, **ct**, **tc** y **tt** según los ángulos diedros H₃C-03'-C3'-C4' y H-04'-C4'-C3' en el anillo B.

Petunidina (Pt), que tiene dos grupos hidroxilo (HO-3' y HO-4') y un grupo metoxilo (H₃CO-5') en el anillo B, presentó ocho posibles estructuras: **ccc**, **cct**, **ctc**, **ctt**, **tcc**, **tct**, **ttc** y **ttt**, determinadas por la disposición de los enlaces H-03', H-04' y H₃C-05' con respecto a

los enlaces C3'-C4' y C4'-C5'. Esta nomenclatura sigue el mismo razonamiento utilizado para delphinidina, que también presenta tres sustituyentes en el anillo B (**Figura 5.7**).

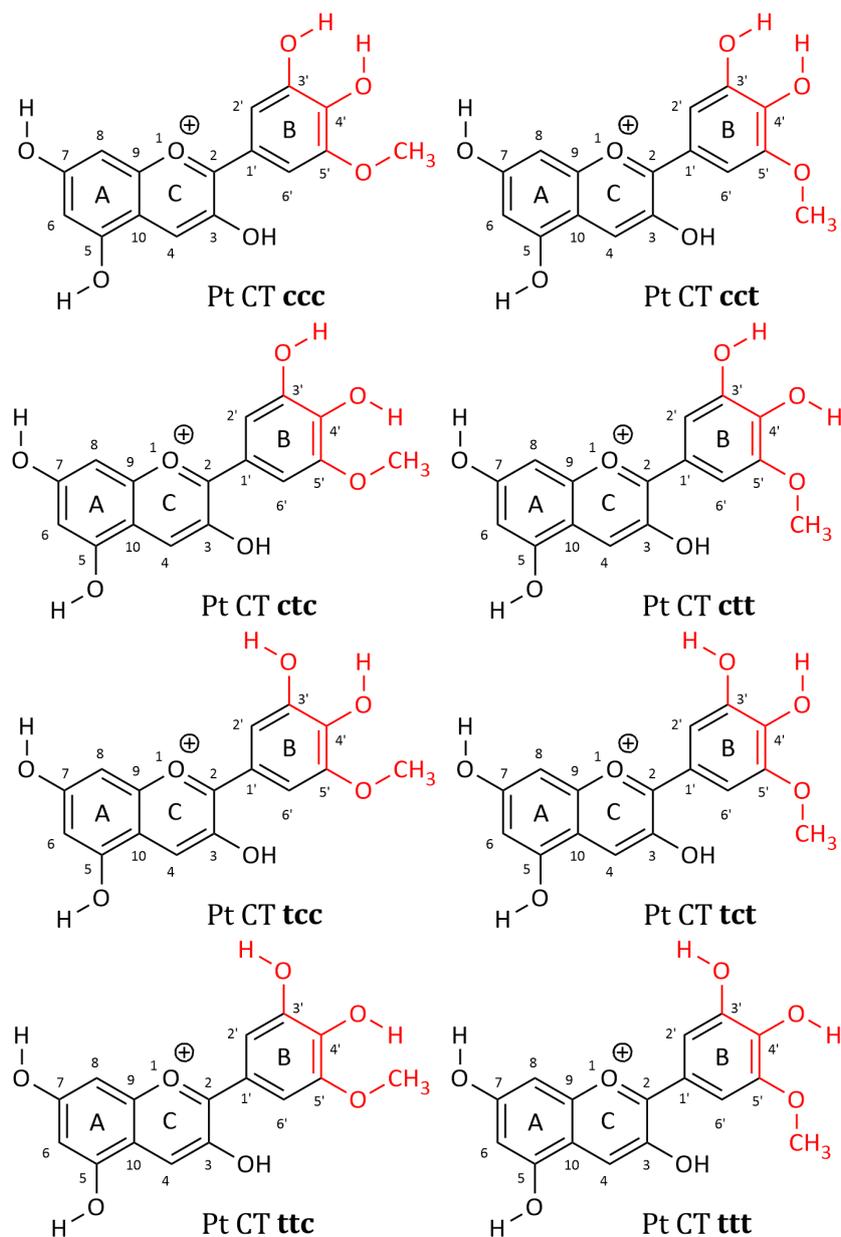


Figura 5.7. Estructuras **ccc**, **cct**, **ctc**, **ctt**, **tcc**, **tct**, **ttc** y **ttt** según los ángulos diedros H-O3'-C3'-C4', H-O4'-C4'-C3' y H₃C-O5'-C5'-C4' en el anillo B.

Malvidina (Mv) se caracteriza por un grupo hidroxilo y dos grupos metoxilo en el anillo B (H₃CO-3', HO-4' y H₃CO-5'). La orientación de estos grupos se definió según la disposición de los enlaces H₃C-O3' y H-O4' respecto al enlace C3'-C4', y el enlace H₃C-O5' respecto al enlace C4'-C5'. Siguiendo la misma metodología aplicada a delphinidina y petunidina, las conformaciones *cis* (**c**) y *trans* (**t**) se utilizaron para describir los ángulos diedros H₃C-O3'-C3'-C4', H-O4'-C4'-C3' y H₃C-O5'-C5'-C4', cercanos a 0° o 180° (**Figura 5.8**).

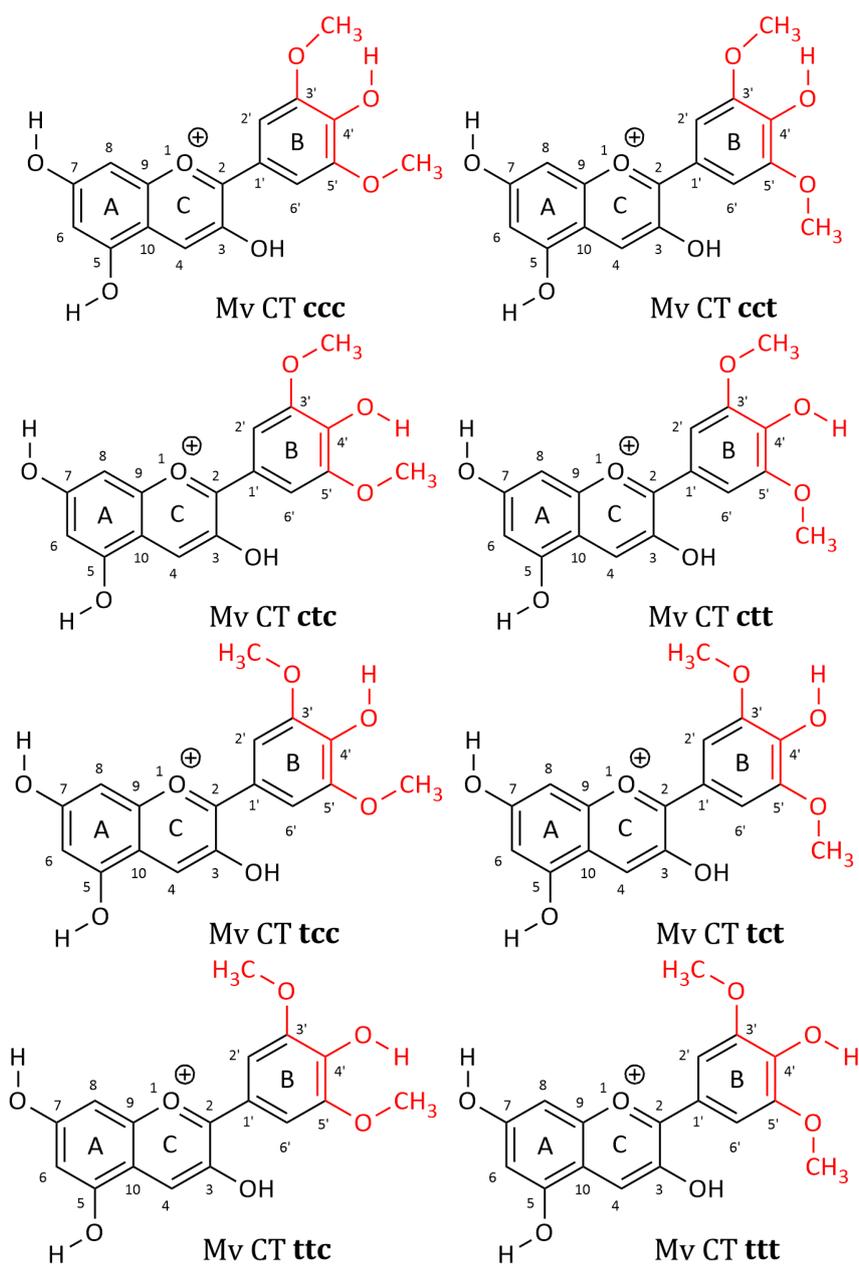


Figura 5.8. Estructuras **ccc**, **cct**, **ctc**, **ctt**, **tcc**, **tct**, **ttc** y **ttt** según los ángulos diedros H₃C-O3'-C3'-C4', H-O4'-C4'-C3' y H₃C-O5'-C5'-C4' en el anillo B.

Para los casos de cianidina, peonidina y petunidina, la disposición asimétrica de los sustituyentes en el anillo B resultó en una singularidad adicional. La rotación del anillo B alrededor del eje del enlace C2-C1' dio lugar a dos estructuras distintas, denominadas **A** y **B**. Estas estructuras se caracterizan por un ángulo diedro O-C2-C1'-C2' cercano a 0° para la conformación **A** y a 180° para la conformación **B**. Por ejemplo, en cianidina, la conformación **A** muestra una numeración horaria del anillo B, mientras que, en **B**, es antihoraria (**Figura 5.9**). Este razonamiento se aplica de manera similar en peonidina y petunidina, donde la disposición de los grupos varía según la conformación (**Figura 5.10**).

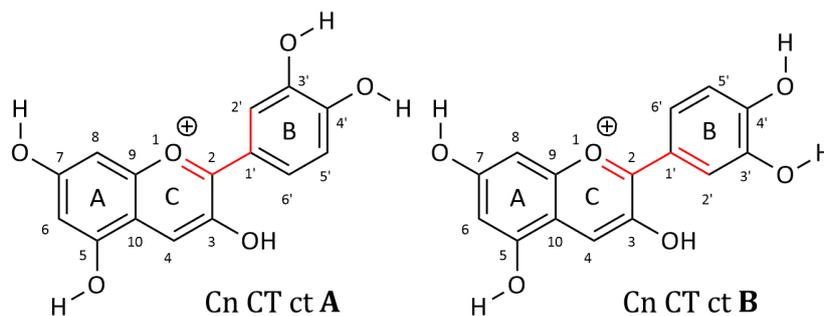


Figura 5.9. Estructuras **A** y **B** según el ángulo diedro O1-C2-C1'-C2' para cianidina.

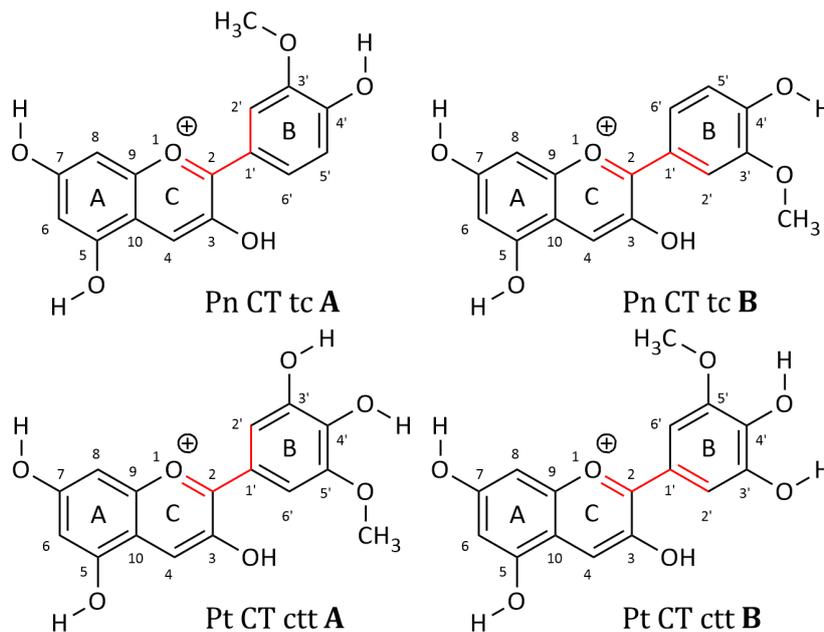


Figura 5.10. Estructuras **A** y **B** según el ángulo diedro O1-C2-C1'-C2' para peonidina y petunidina.

Además, se consideró la posible planaridad de estos compuestos. Las estructuras que presentan los anillos A/C-B en un mismo plano se designaron con la letra **P** antes de la designación de la conformación (**Figura 5.11**).

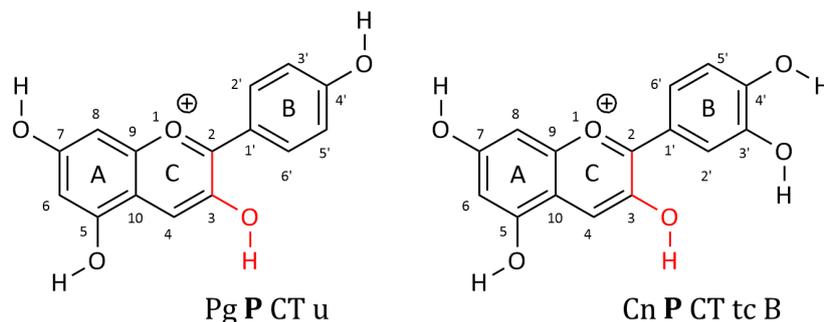


Figura 5.11. Estructuras **P** según la planaridad de los anillos A/C y B, como también el ángulo diedro C2-C3-O3-H.

Algunas estructuras no mantienen la coplanaridad entre los anillos A/C-B, lo que se refleja en ángulos diedros O-C2-C1'-C2' diferentes de 0° o 180°. En estos casos, el grupo HO-3 se orienta hacia el anillo B. Cuando el HO-3 se ubica por encima del anillo B, la

conformación se designa como **Z1**, y cuando se encuentra por debajo, se denomina **Z2** (Figura 5.12).

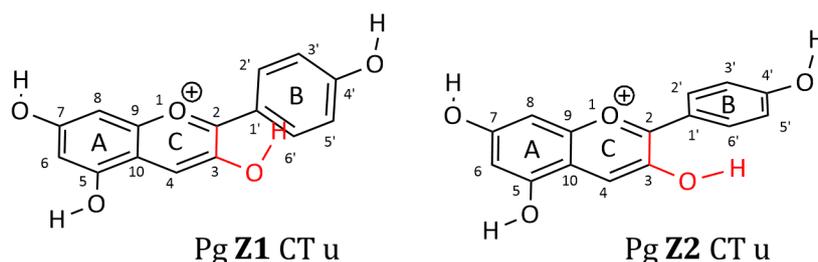


Figura 5.12. Estructuras **Z1** y **Z2** según la planaridad de los anillos A/C y B, como también el ángulo diedro C2-C3-O3-H.

5.3. Metodología

Para abordar el estudio y exploración del espacio conformacional de estos compuestos, se diseñó una búsqueda racional basada en sus características estructurales. La presencia de tres anillos aromáticos sugiere una rigidez estructural que limita las torsiones a los enlaces que los conectan. Dado que estos compuestos sólo poseen hidroxilo y metoxilo en posiciones fijas dentro de su estructura, se propuso evaluar los diferentes ángulos diedros que los componen. Este enfoque permitiría obtener información detallada sobre las energías y disposiciones espaciales de los sustituyentes, definiendo así las estructuras iniciales para un análisis exhaustivo del espacio conformacional.

El estudio computacional se llevó a cabo utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT, *Density Functional theory*) (Becke, 2014) con el nivel de teoría B3LYP, que combina el funcional híbrido triparamétrico de Becke (B3) con los funcionales de correlación de Lee, Yang y Parr (LYP) (Becke, 1988, 2014), acompañado de bases de Pople (McLean & Chandler, 1980). En una primera etapa, se dibujaron las estructuras moleculares de las seis antocianidinas en estudio (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina) y se optimizaron al nivel de teoría B3LYP/6-31G para obtener las geometrías y energías iniciales. La re-optimización se efectuó a un nivel de teoría superior, B3LYP/6-311G++(d,p), que se usó en todos los cálculos posteriores.

El estudio del espacio conformacional de la pelargonidina, cianidina y delphinidina se realizó fijando la posición de los grupos hidroxilo HO-3, HO-5, HO-7, y de HO-3', HO-4' y HO-5' según el anillo B de cada antocianidina. En el caso de las antocianidinas metoxiladas (peonidina, petunidina y malvidina), se evaluaron tanto los grupos hidroxilo HO-3, HO-5, HO-7, HO-3', HO-4' como los metoxilos H₃CO-3' y H₃CO-5' según la antocianidina considerada.

Se llevaron a cabo escaneos rígidos de 10° para los ángulos diedros (τ) H-O-C3-C2, O1-C2-C1'-C2', H-O-C5-C6, H-O-C7-C6 y H-O-C4'-C3' en todos los compuestos. Adicionalmente, se estudiaron variaciones similares para τ H-O-C3'-C4' en cianidina, delphinidina y petunidina; τ H-O-C5'-C4' en delphinidina; τ H₃C-O-C5'-C4' en petunidina y malvidina; y τ H₃C-O-C3'-C4' en malvidina. Estos escaneos permitieron determinar las superficies de energía potencial de los compuestos analizados (Foresman & Frisch, 2015).

A partir de esta información, se seleccionaron los conformeros de mínima y máxima energía, los cuales fueron posteriormente optimizados al mismo nivel de teoría (B3LYP/6-311G++(d,p)), con geometrías completamente relajadas. Se evaluaron los distintos conformeros en tres solventes (ácido acético, metanol y agua). Se calcularon las frecuencias vibracionales para verificar si las estructuras optimizadas tenían en cuenta los mínimos de energía. A partir de este estudio, también se logró obtener la energía del punto cero (ZPE, *Zero-Point Energy*) al mismo nivel de cálculo para realizar las correcciones necesarias en todas las energías. Los detalles de lo realizado se encuentran en la Parte Experimental (**Capítulo 9**).

5.4. Curvas de energía potencial

Para iniciar el estudio de los mapas de energía potencial, se seleccionó como estructura de partida el conformero de menor energía, en el cual los sustituyentes del anillo A se encuentran en su conformación **CT**. Además, se eligió la disposición del grupo HO-3 con un ángulo diedro de 180° respecto al enlace C2-C3-O3-H, representando así los conformeros más estables energéticamente.

En el caso de las antocianidinas hidroxiladas, como pelargonidina, cianidina y delphinidina, se tomaron las disposiciones **d**, **tc B**, y **ctt** para los sustituyentes del anillo B respectivamente. El primer ángulo diedro evaluado fue O1-C2-C1'-C2', el cual involucra el enlace entre los anillos C y B. Se analizó el efecto de la rotación del anillo B a intervalos de 10°, alrededor del eje de enlace C2-C1' (**Figura 5.14**).

Se identificaron posiciones energéticamente favorables en el anillo B, manteniendo la coplanaridad con los anillos A y C. A partir de este análisis, sólo dos conformaciones fueron viables para cada compuesto. Por ejemplo, en pelargonidina se obtuvieron las estructuras **Pg P CT d** y **Pg P CT u**; en cianidina, **Cn P CT tc B** y **Cn P CT tc A**; y en delphinidina, **Df P CT ctt** y **Df P CT tcc**, siendo la segunda estructura en cada caso menos estable que la primera.

Como era de esperar, las mayores variaciones de energía se observaron con rotaciones de 90° en todos los casos, es decir, cuando el anillo B se orienta perpendicular al anillo C. Los máximos de energía alcanzados a 90° y 270° para el ángulo diedro O1-C2-C1'-C2' se optimizaron, sin encontrar conformeros no planos.

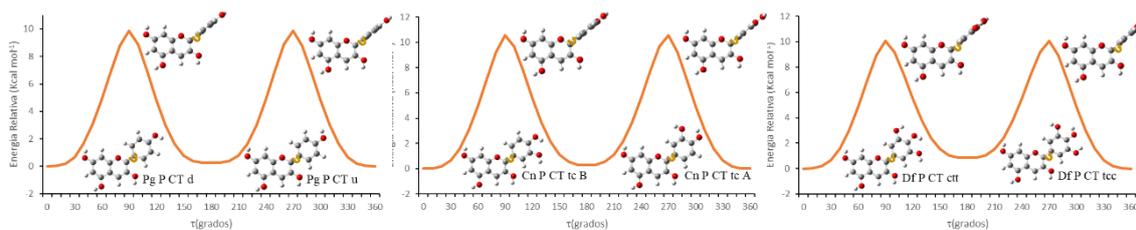


Figura 5.14. Energía de los conformeros **Pg P CT d**, **Cn P CT tc B** y **Df P CT ctt** en función de la variación del ángulo diedro O1-C2-C1'-C2', que describe la rotación del anillo B alrededor del eje del enlace C2-C1'.

Todas las antocianidinas en estudio contenían los grupos HO-5 y HO-7, lo que definía una distribución tipo resorcinol en el anillo A. Se llevó a cabo la rotación del enlace O5-H en intervalos de 10° alrededor del eje C5-O5 (**Figura 5.15**). El arreglo más estable, que corresponde al único mínimo de energía, para el grupo HO-5 se alcanzó a 0° con respecto al enlace C6-C5, mientras que la orientación desfavorable, con la máxima energía, se observó a 180° .

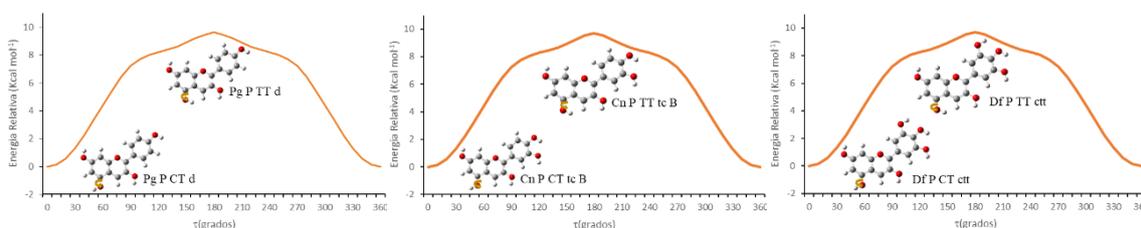


Figura 5.15. Energía de los conformeros **Pg P CT d**, **Cn P CT tc B** y **Df P CT ctt** en función de la variación del ángulo diedro C6-C5-O5-H, que describe la rotación del enlace O5-H alrededor del eje C5-O5.

Continuando con el análisis, se realizó la rotación del enlace O7-H en intervalos de 10° alrededor del eje C7-O7, considerando la variación del ángulo diedro C6-C7-O7-H (**Figura 5.16**). Para cada uno de los compuestos estudiados, las estructuras de menor energía se obtuvieron a 180° , mientras que las de mayor energía surgieron a 90° y 270° , cuando el grupo HO-7 estaba fuera del plano del anillo A. La alineación espacial de los grupos HO-5 y HO-7 en el mismo plano del anillo A contribuyó de manera significativa a la estabilización de la estructura molecular.

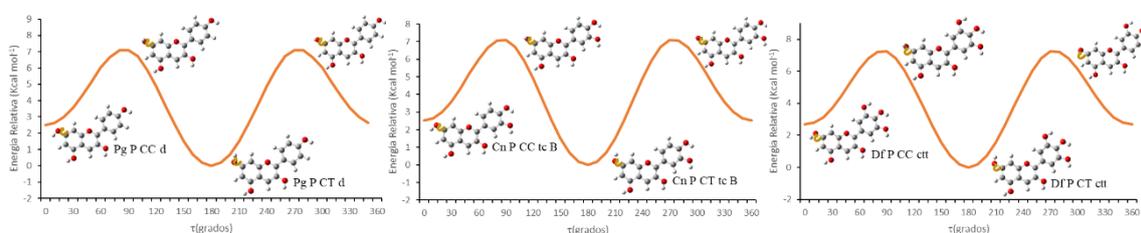


Figura 5.16. Energía de los conformeros **Pg P CC d**, **Cn P CC tc B** y **Df P CC ctt** en función de la variación del ángulo diedro C6-C7-O7-H, que describe la rotación del enlace O7-H alrededor del eje C7-O7.

También se evaluó la rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4', variando el ángulo diedro C3'-C4'-O4'-H desde 0° en intervalos de 10° , en cada una de las tres antocianidinas (**Figura 5.17**).

En el caso de pelargonidina, se identificaron dos conformaciones: **Pg P CT d** y **Pg P CT u**, siendo la segunda menos estable que la primera, como se discutió anteriormente. Los máximos de energía se alcanzaron a 90° y 270° , cuando el grupo HO-4' se encontraba fuera del plano del anillo B. Para cianidina **Cn P CT tc B**, la energía mínima se observó a 0° , mientras que los máximos ocurrieron a 90° y 270° , siguiendo el mismo patrón indicado previamente. Un mínimo local apareció a 180° , debido a la repulsión estérica entre los grupos HO-3' y HO-4'. La conformación más estable, con ambos hidroxilos orientados en la

misma dirección (en sentido horario), se encontró a 0° . En **Df P CT ctt**, un único mínimo se observó a 180° , mientras que el máximo de energía a 0° reflejó la repulsión estérica entre los hidrógenos de HO-3' y HO-4', ambos en posiciones opuestas. La orientación coordinada en sentido horario de los tres sustituyentes del anillo B proporcionó mayor estabilidad al conformero.

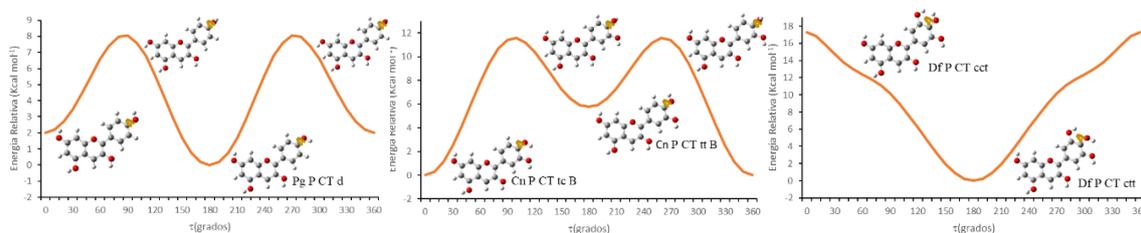


Figura 5.17. Energía de los conformeros **Pg P CT d**, **Cn P CT tc B**, y **Df P CT cct**, al variar el ángulo diedro C3'-C4'-O4'-H, describiendo la rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4'.

Para identificar todas las posibles disposiciones del anillo B en cianidina, también se analizó la variación del ángulo diedro C3'-C4'-O4'-H desde 0° en intervalos de 10° en los conformeros **Cn P CT ct B**, **Cn P CT tc A** y **Cn P CT ct A** (Figura 5.18 (a-c)). **Cn P CT ct B** mostró un mínimo de energía a 180° y un máximo a 0° (Figura 5.18 a), patrón similar al observado en **Cn P CT ct A** (Figura 5.18 c). En cambio, la curva para **Cn P CT tc A** (Figura 5.18 b) siguió un comportamiento similar a la de **Cn P CT tc B** (Figura 5.17), con un mínimo de energía a 0° y dos máximos a 90° y 270° , donde HO-4' estaba fuera del plano del anillo B. En las estructuras **Cn P CT ct B** y **Cn P CT ct A**, la repulsión entre los hidroxilos HO-3' y HO-4' desestabilizó la molécula más que la ubicación fuera del plano de uno de estos hidroxilos. La orientación de HO-3' y HO-4' hacia direcciones opuestas a 180° proporcionó mayor estabilidad, tanto en sentido horario como antihorario.

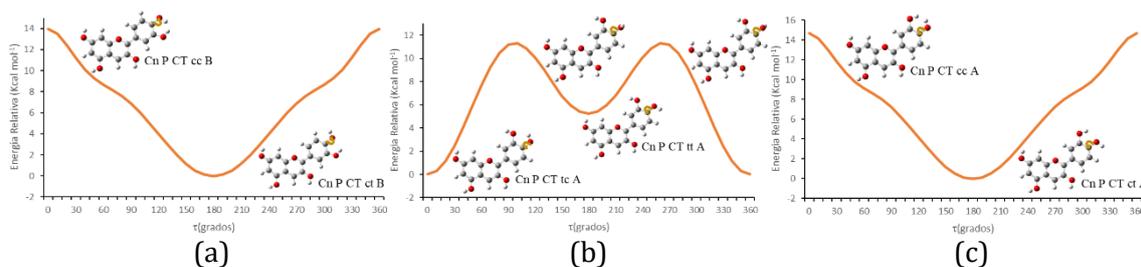


Figura 5.18. Energía de los conformeros **Cn P CT ct B**, **Cn P CT tc A** y **Cn P CT ct A**, al variar el ángulo diedro C3'-C4'-O-H, describiendo la rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4'.

Al considerar el ángulo diedro C4'-C3'-O-H, se observaron tendencias similares. Los mínimos de energía se alcanzaron según la orientación horaria o antihoraria de los hidroxilos (Figura 5.19). La rotación del enlace O3'-H con respecto al eje del enlace C3'-O3' en los conformeros **Cn P CT tc B**, **Cn P CT ct B**, **Cn P CT tc A** y **Cn P CT ct A** condujo a los conformeros de mayor energía: **Cn P CT cc B**, **Cn P CT tt B**, **Cn P CT cc A**, y **Cn P CT tt A** respectivamente.

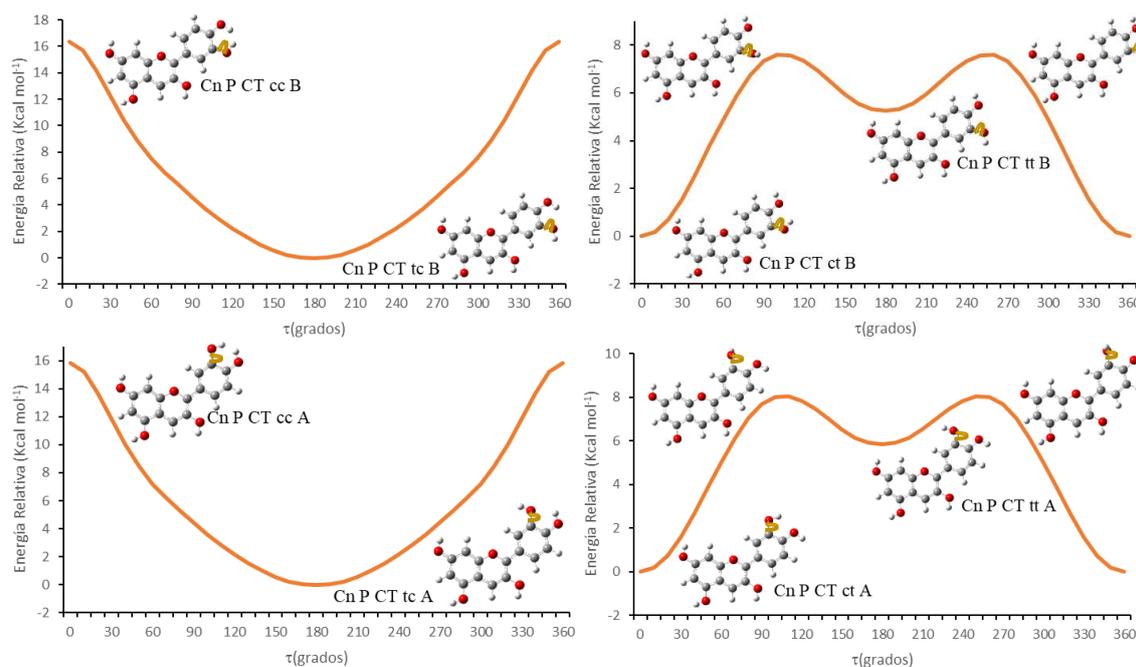


Figura 5.19. Energía de los conformeros **Cn P CT tc B**, **Cn P CT ct B**, **Cn P CT tc A**, y **Cn P CT ct A**, al variar el ángulo diedro C4'-C3'-O3'-H, describiendo la rotación del enlace O3'-H con respecto al eje del enlace C3'-O3'.

Dado que la rotación del enlace O3'-H con respecto al eje C3'-O3' en delfinidina mostró resultados similares a los observados previamente, se realizó un escaneo rígido en intervalos de 10°, rotando el enlace O5'-H respecto al eje del enlace C5'-O5' (variación del ángulo diedro C4'-C5'-O5'-H) (**Figura 5.20**). La estructura **Df P CT ctt** alcanzó su mínima energía a 180° y su máxima a 0°. Este comportamiento se explicó por la estabilidad alcanzada cuando los sustituyentes están alineados en sentido horario, mientras que el máximo de energía a 0° se debió a la repulsión estérica con HO-4'. En la estructura **Df P CT tcc**, el mínimo de energía se alcanzó a 0°, mientras que los máximos se encontraron a 90° y 270°. La estabilidad se logró cuando los tres hidroxilos del anillo B se orientaron en sentido antihorario. Un mínimo local de energía a 180° en el conformero **Df P CT tct** indicó que, además de los efectos estéricos entre los sustituyentes, la orientación en sentido horario o antihorario también juega un papel clave en la estabilización de la molécula.

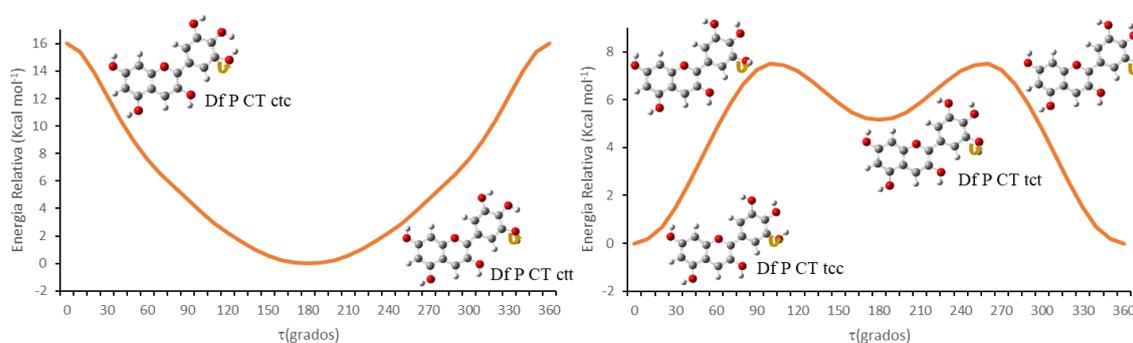


Figura 5.20. Energía de los conformeros **Df P CT ctt** y **Df P CT tcc**, al variar el ángulo diedro C4'-C5'-O5'-H, describiendo la rotación del enlace O5'-H con respecto al eje del enlace C5'-O5'.

La misma metodología previamente descrita se aplicó al análisis de las antocianidinas metoxiladas: peonidina, petunidina y malvidina, tomando las disposiciones **tc B**, **ctt A**, y **ttt** para los sustituyentes del anillo B respectivamente. El primer ángulo diedro evaluado fue O1-C2-C1'-C2', lo que permitió analizar el efecto de la rotación del anillo B en intervalos de 10° alrededor del eje del enlace C2-C1' (**Figura 5.21**).

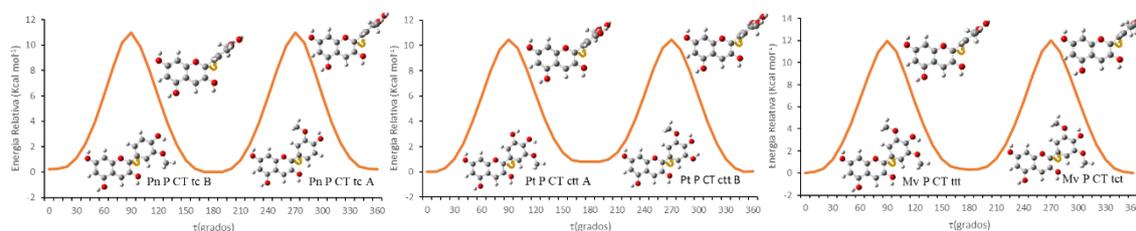


Figura 5.21. Energía de los conformeros **Pn P CT tc B**, **Pt P CT ctt A**, y **Mv P CT ttt** en función de la variación del ángulo diedro O1-C2-C1'-C2', que describe la rotación del anillo B alrededor del eje del enlace C2-C1'.

Nuevamente, se identificaron posiciones energéticamente favorables en el anillo B, manteniendo la coplanaridad con los anillos A y C. A partir de este análisis, se encontraron dos conformaciones viables para cada compuesto: en peonidina, las estructuras **Pn P CT tc B** y **Pn P CT tc A**; en petunidina, **Pt P CT ctt A** y **Pt P CT ctt B**; y en malvidina, **Mv P CT ttt** y **Mv P CT tct**, siendo la segunda conformación en cada caso menos estable que la primera.

Como era de esperar, las mayores variaciones de energía se observaron con rotaciones de 90° en todos los casos, es decir, cuando el anillo B se orientaba perpendicular al anillo C. Los máximos de energía a 90° y 270° para el ángulo diedro O1-C2-C1'-C2' se optimizaron, sin hallar conformeros no planos. A continuación, se analizaron las disposiciones de los grupos HO-5 (**Figura 5.22**) y HO-7 (**Figura 5.23**), encontrando un comportamiento similar al de las antocianidinas hidroxiladas. La disposición tipo **CT** también resultó ser la más estable para estos compuestos.

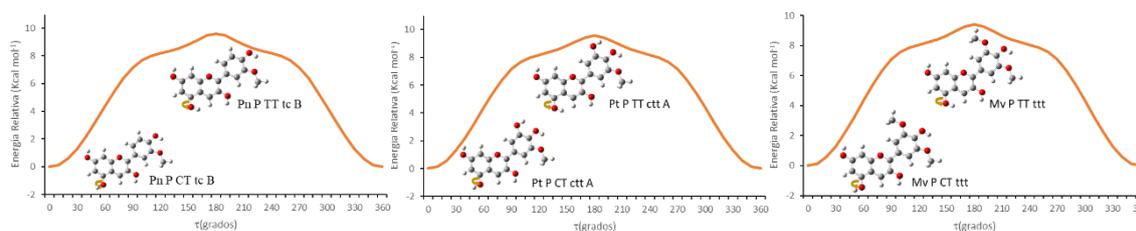


Figura 5.22. Energía de los conformeros **Pn P CT tc B**, **Pt P CT ctt A**, y **Mv P CT ttt** en función de la variación del ángulo diedro C6-C5-O5-H, que describe la rotación del enlace O5-H alrededor del eje C5-O5.

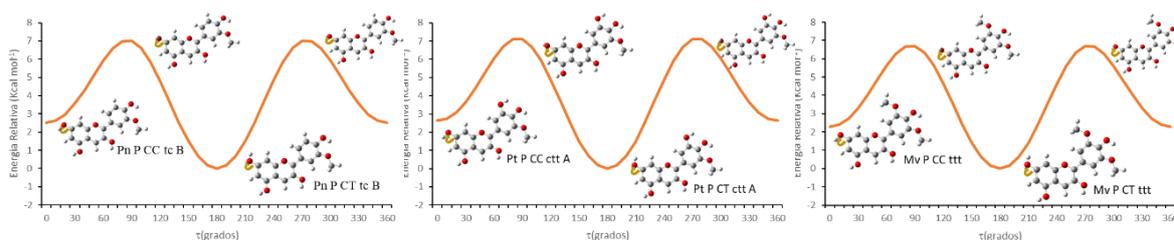


Figura 5.23. Energía de los conformeros **Pn P CT tc B**, **Pt P CT ctt A**, y **Mv P CT ttt** en función de la variación del ángulo diedro C6-C7-O7-H, que describe la rotación del enlace O7-H alrededor del eje C7-O7.

Uno de los aspectos más relevantes en el análisis de las antocianidinas metoxiladas fue la disposición de los sustituyentes del anillo B. Al reemplazar uno o dos grupos hidroxilo por metoxilos, más voluminosos y limitando la rotación libre, se observaron diferencias significativas en el comportamiento conformacional. En primer lugar, se evaluó la rotación del enlace O4'-H respecto al eje del enlace C4'-O4', común a todas las antocianidinas, variando el ángulo diedro C3'-C4'-O4'-H en intervalos de 10° (**Figura 5.24**).

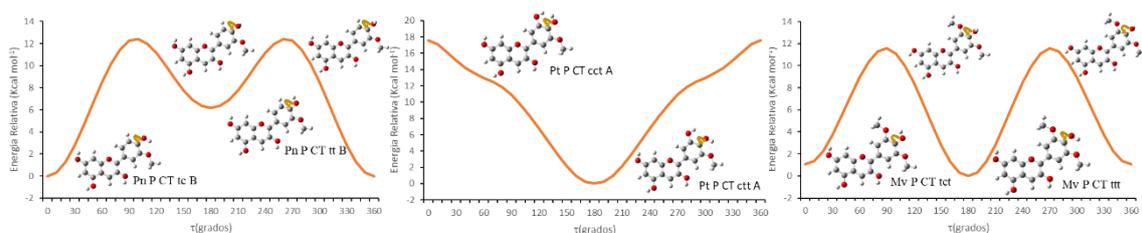


Figura 5.24. Energía de los conformeros **Pn P CT tc B**, **Pt P CT ctt A**, y **Mv P CT ttt** en función de la variación del ángulo diedro C3'-C4'-O4'-H, describiendo la rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4'.

En el caso de peonidina, se identificaron dos conformaciones: **Pn P CT tc B** y **Pn P CT tt B**, siendo la segunda menos estable. Los máximos de energía se alcanzaron a 90° y 270°, cuando el grupo HO-4' estaba fuera del plano del anillo B. Para **Pt P CT ctt A**, la energía mínima se observó a 180°, mientras que a 0°, debido a la repulsión estérica entre los grupos hidroxilo, la rotación libre fue limitada, como se discutió en delphinidina. En malvidina, se identificaron dos mínimos: uno a 180° para el conformero **Mv P CT ttt** y otro a 0° para **Mv P CT tct**, con una energía levemente mayor. Este comportamiento resalta que, a pesar de tener dos grupos metoxilo en las posiciones 3' y 5', la orientación del enlace O4'-H no es indiferente, favoreciéndose la disposición en sentido horario sobre la antihorario, como se observó en las antocianidinas hidroxiladas.

Para peonidina, dado que su estructura es similar a la de cianidina, se continuó evaluando la rotación del ángulo diedro C4'-C3'-O3'-CH₃ (**Figura 5.25**). Los resultados mostraron que sólo los conformeros en los que el grupo metoxilo se orienta opuesto al grupo hidroxilo, con un ángulo diedro de 180°, son estables. Esto se debe a la fuerte repulsión estérica entre los grupos. De esta manera, el grupo metoxilo sólo puede adoptar conformaciones tipo **t**. Los conformeros con ángulos de 90° y 270° fueron reoptimizados,

pero presentaron frecuencias imaginarias. Por tanto, las posibles disposiciones de los sustituyentes del anillo B en peonidina son **tc** y **tt**, según este análisis.

Al analizar los grupos metoxilo en malvidina, se obtuvieron resultados similares a los de peonidina, debido al tamaño voluminoso de los grupos metoxilo en las posiciones $\text{CH}_3\text{O}-3'$ y $\text{CH}_3\text{O}-5'$. Las variaciones en los ángulos diedros $\text{C}4'-\text{C}3'-\text{O}3'-\text{CH}_3$ y $\text{C}4'-\text{C}5'-\text{O}5'-\text{CH}_3$ (**Figura 5.26**) confirmaron que la única disposición posible para estos grupos es del tipo **t**. Dependiendo de la orientación del grupo $\text{HO}-4'$, la barrera energética varía. Este análisis sugiere que las únicas conformaciones posibles para los sustituyentes del anillo B en malvidina son **tct** y **ttt**, manteniendo los grupos metoxilo en los extremos y rotando únicamente el grupo hidroxilo.

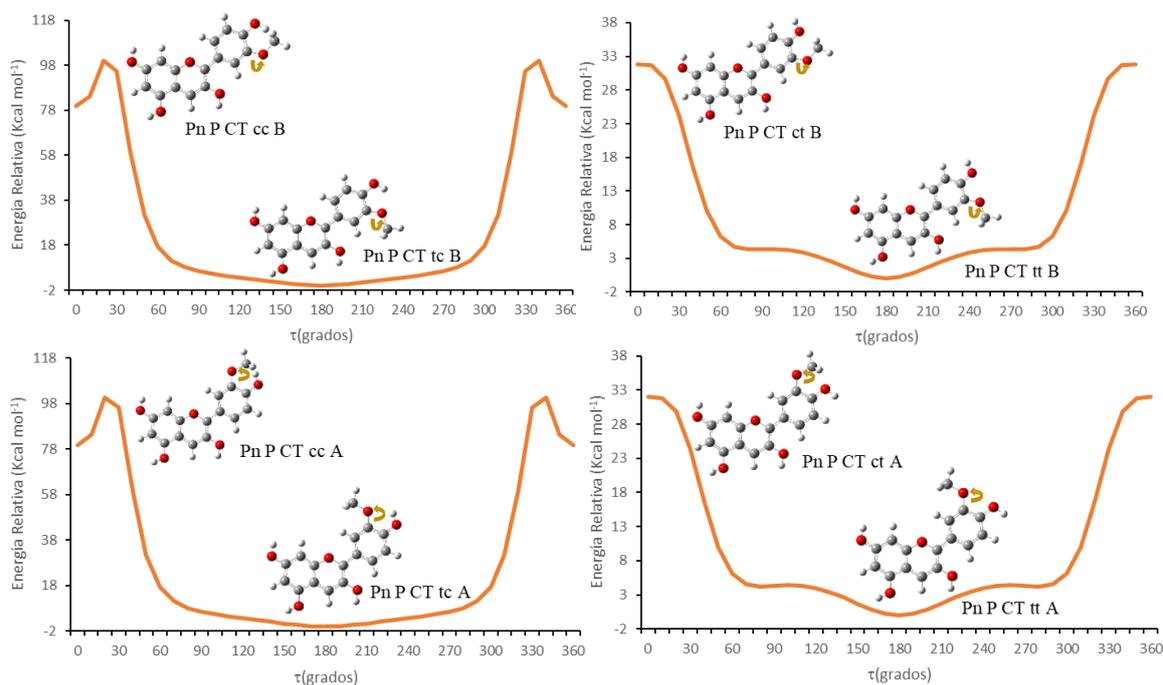


Figura 5.25. Energía de los conformeros **Pn P CT tc B**, **Pn P CT tt B**, **Pn P CT tc A**, y **Pn P CT tt A**, al variar el ángulo diedro $\text{C}4'-\text{C}3'-\text{O}3'-\text{CH}_3$, describiendo la rotación del enlace $\text{O}3'-\text{CH}_3$ con respecto al eje del enlace $\text{C}3'-\text{O}3'$.

En el caso de petunidina, que posee $\text{HO}-3'$, como cianidina y delfinidina, y un grupo metoxilo en la posición $5'$, como malvidina, se obtuvieron resultados combinados. Al analizar la rotación del ángulo diedro $\text{C}4'-\text{C}3'-\text{O}3'-\text{H}$, los gráficos fueron similares a los de cianidina y delfinidina (**Figura 5.27**). Por otro lado, al considerar la rotación del ángulo diedro $\text{C}4'-\text{C}5'-\text{O}5'-\text{CH}_3$, los resultados fueron comparables a los de malvidina (**Figura 5.28**). La coordinación de los grupos $\text{HO}-3'$ y $\text{HO}-4'$ en orientaciones horaria y antihoraria proporcionó mayor estabilidad, encontrando mínimos de energía. Para el grupo $\text{CH}_3\text{O}-5'$, sólo fue posible la orientación tipo **t**, como se mencionó anteriormente.

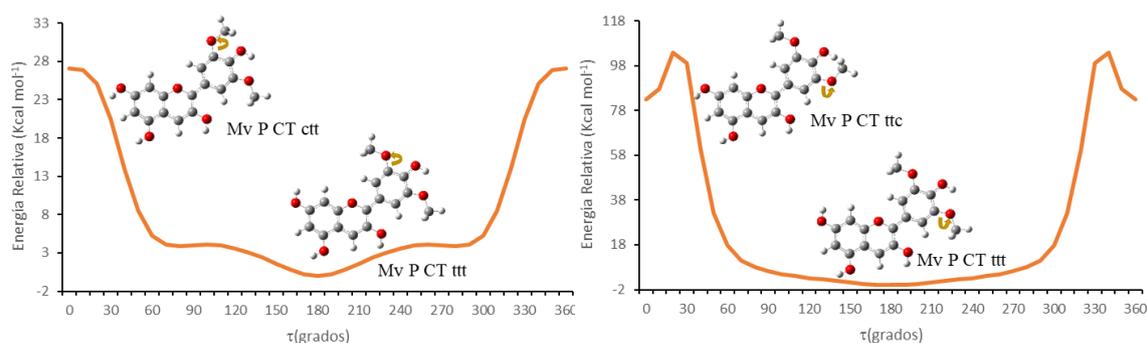


Figura 5.26. Energía del conformero **Mv P CT ttt** al variar los ángulos diedros $C4'-C3'-O3'-CH_3$ y $C4'-C5'-O5'-CH_3$, describiendo la rotación de los enlaces $O3'-CH_3$ y $O5'-CH_3$ con respecto a los ejes de los enlaces $C3'-O3'$ y $C5'-O5'$ respectivamente.

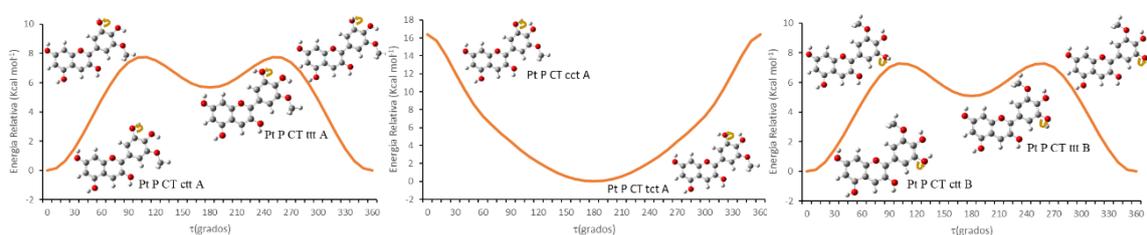


Figura 5.27. Energía de los conformeros **Pt P CT ctt A**, **Pt P CT tct A**, y **Pt P CT ctt B**, al variar el ángulo diedro $C4'-C3'-O3'-H$, describiendo la rotación del enlace $O3'-H$ con respecto al eje del enlace $C3'-O3'$.

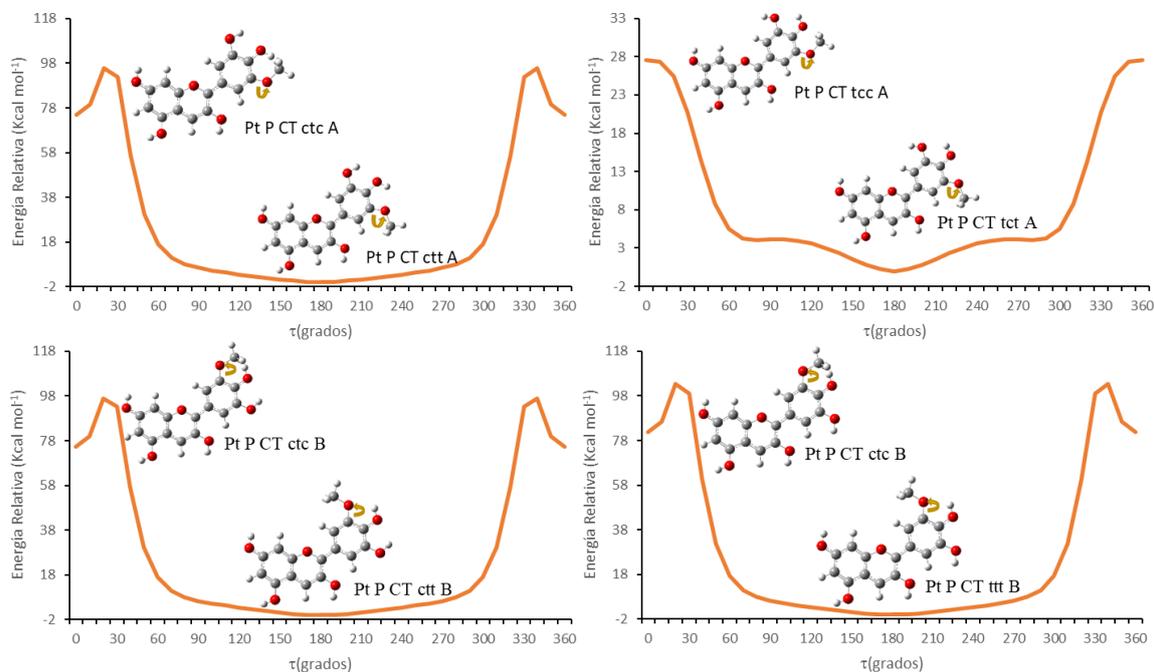


Figura 5.28. Energía de los conformeros **Pt P CT ctt A**, **Pt P CT tct A**, **Pt P CT ctt B**, y **Pt P CT ttt B**, al variar el ángulo diedro $C4'-C5'-O5'-CH_3$, describiendo la rotación del enlace $O5'-CH_3$ con respecto al eje del enlace $C5'-O5'$.

Para finalizar el estudio de las antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas, se evaluó la disposición espacial del grupo HO-3, analizando el ángulo diedro $C2-C3-O3-H$ (**Figura**

5.29). En todos los compuestos estudiados, se observó un mínimo global de energía cuando HO-3 estaba orientado a 180°. En contraste, se obtuvo un máximo de energía al orientar HO-3 hacia el anillo B, con un ángulo de 0°, lo que indica una conformación menos estable debido a interacciones estéricas. Estas disposiciones menos favorables fueron reoptimizadas, obteniéndose los confórmeros no planos (**Z**).

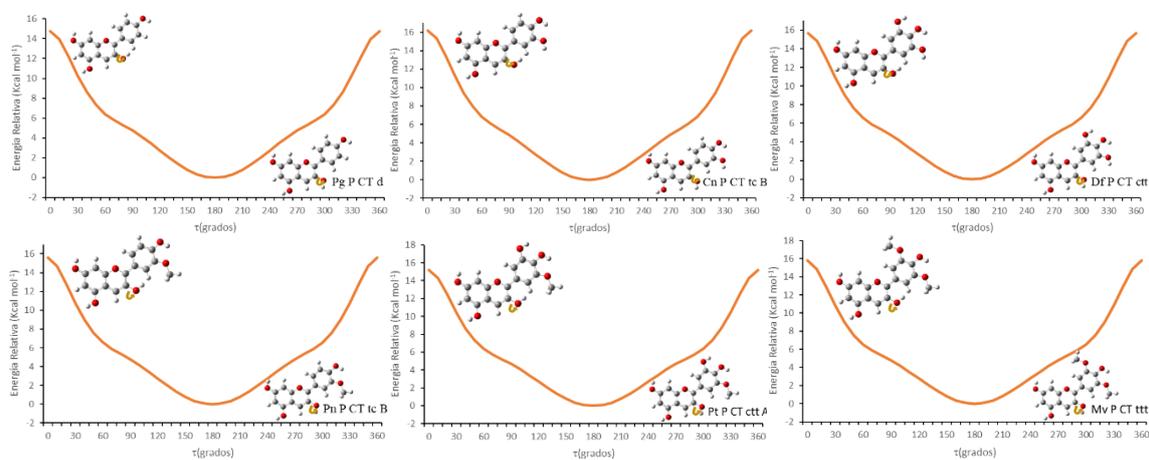


Figura 5.29. Energía de los confórmeros **Pg P CT d**, **Cn P CT tc B**, **Df P CT ctt**, **Pn P CT tc B**, **Pt P CT ctt A**, y **Mv P CT ttt**, al variar el ángulo diedro C2-C3-O3-H, describiendo la rotación del enlace O3-H con respecto al eje del enlace C3-O3.

El mismo análisis se realizó para los confórmeros **Z** de las seis antocianidinas, completando así el estudio del espacio conformacional de estos compuestos. Sin embargo, para evitar redundancias y por razones de espacio, no se incluyen los mapas de energía potencial de estos confórmeros, ya que el comportamiento observado fue muy similar al de las estructuras planas.

5.5. Análisis del espacio conformacional

Las antocianidinas en estudio se caracterizan por presentar tanto confórmeros planos como no planos, de acuerdo con lo previamente descrito en la literatura (Woodford, 2005; Sakata *et al.*, 2006). En esta Tesis, se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de ambos tipos de conformaciones, permitiendo un análisis más completo del espacio conformacional de estas moléculas.

Es bien sabido que la orientación del grupo HO-3 juega un papel fundamental en la planaridad de toda la estructura de la antocianidina. En particular, los ángulos diedros O1-C2-C1'-C2' y C2-C3-O3-H son determinantes en la coplanaridad entre los anillos A/C y B. La variación en la posición del hidrógeno en el grupo HO-3 afecta directamente la alineación de los anillos B y C, debilitando el efecto estabilizador del sistema π (Aparicio, 2010).

Cuando el anillo B se dispone de manera perpendicular al anillo C, la molécula experimenta una desestabilización significativa, lo que genera confórmeros menos

favorecidos debido a la pérdida de conjugación entre los anillos. Esta conformación también puede afectar negativamente las deslocalizaciones σ - σ y σ - π , contribuyendo a una mayor inestabilidad.

En todos los casos analizados, las estructuras similares al resorcinol en el anillo A resultaron ser las más estables, en consonancia con estudios previos realizados en nuestros laboratorios con flavonoides (Lobayan *et al.*, 2009, 2012, 2013, 2020; Bentz *et al.*, 2010, 2014a, 2014b, 2016, 2017). Los arreglos **CC** y **CT** del anillo A mostraron diferencias energéticas relacionadas con los efectos de deslocalización, como se ha informado anteriormente (Bentz *et al.*, 2014a, 2014b, 2016, 2017; Lobayan *et al.*, 2020). La disposición espacial de los grupos HO-5 y HO-7 dentro del mismo plano del anillo A fue clave para estabilizar la estructura. En cambio, cuando estos grupos se encontraban fuera del plano, se perdían los efectos estabilizadores asociados a la deslocalización de carga, como se ha documentado previamente (Bentz *et al.*, 2014a, 2014b, 2016, 2017; Lobayan *et al.*, 2020).

En cuanto al anillo B, las conformaciones más estables fueron aquellas en las que los sustituyentes permanecían en el plano del anillo, minimizando las repulsiones estéricas y promoviendo los efectos estabilizadores observados también en el anillo A. Las disposiciones más favorables para el anillo B fueron aquellas que lograron una armonización entre la estabilidad conformacional y la disminución de interacciones estéricas.

El análisis exhaustivo del espacio conformacional llevó a la identificación de un conjunto de conformeros minimizados energéticamente para las antocianidinas hidroxiladas, respaldados por la ausencia de frecuencias imaginarias. En el caso de la pelargonidina, se identificaron veinte conformeros: **Pg P CT d**, **Pg P CT u**, **Pg P CC d**, **Pg P CC u**, **Pg Z1 CT d**, **Pg Z2 CT d**, **Pg Z1 CT u**, **Pg Z2 CT u**, **Pg Z1 CC u**, **Pg Z2 CC u**, **Pg Z1 CC d**, **Pg Z2 CC d**, **Pg Z1 TC u**, **Pg Z2 TC u**, **Pg Z1 TC d**, **Pg Z2 TC d**, **Pg Z1 TT d**, **Pg Z2 TT d**, **Pg Z1 TT u**, y **Pg Z2 TT u**. Para la cianidina, se encontraron sesenta conformeros: **Cn P CT tc B**, **Cn P CT ct A**, **Cn P CT tc A**, **Cn P CC tc B**, **Cn P CC tc A**, **Cn P CC ct A**, **Cn P CT ct B**, **Cn P CC ct B**, **Cn Z1 CT ct A**, **Cn Z2 CT ct A**, **Cn Z1 CT ct B**, **Cn Z2 CT ct B**, **Cn Z2 CT tc A**, **Cn Z1 CT tc A**, **Cn Z1 CC ct A**, **Cn Z2 CC ct A**, **Cn Z1 CC ct B**, **Cn Z2 CC ct B**, **Cn Z1 CC tc A**, **Cn Z2 CC tc A**, **Cn Z2 CT tc B**, **Cn Z1 CT tc B**, **Cn Z1 CC tc B**, **Cn Z2 CC tc B**, **Cn P CT tt A**, **Cn P CT tt B**, **Cn P CC tt A**, **Cn P CC tt B**, **Cn Z1 TC ct B**, **Cn Z2 TC ct B**, **Cn Z1 TC ct A**, **Cn Z2 TC ct A**, **Cn Z1 TC tc A**, **Cn Z2 TC tc A**, **Cn Z1 TT ct A**, **Cn Z2 TT ct A**, **Cn Z1 TC tc B**, **Cn Z2 TC tc B**, **Cn Z1 CT tt A**, **Cn Z2 CT tt A**, **Cn Z1 TT ct B**, **Cn Z2 TT ct B**, **Cn Z1 CC tt A**, **Cn Z2 CC tt A**, **Cn Z2 TT tc A**, **Cn Z1 TT tc A**, **Cn Z1 CT tt B**, **Cn Z2 CT tt B**, **Cn Z1 TT tc B**, **Cn Z2 TT tc B**, **Cn Z1 CC tt B**, **Cn Z2 CC tt B**, **Cn Z1 TC tt A**, **Cn Z2 TC tt A**, **Cn Z1 TC tt B**, **Cn Z2 TC tt B**, **Cn Z1 TT tt A**, **Cn Z2 TT tt A**, **Cn Z2 TT tt B** y **Cn Z1 TT tt B**. Por último, para la delfinidina, se encontraron treinta y siete conformeros: **Df P CT ctt**, **Df P CC ctt**, **Df P CT tcc**, **Df P CC tcc**, **Df Z1 CT tcc**, **Df Z2 CT tcc**, **Df Z2 CT ctt**, **Df Z1 CT ctt**, **Df Z1 CC tcc**, **Df Z2 CC tcc**, **Df Z1 CC ctt**, **Df Z2 CC ctt**, **Df P CC ttt**, **Df P CT tct**, **Df P CC tct**, **Df Z2 TC tcc**, **Df Z1 TC tcc**, **Df Z1 TC ctt**, **Df Z2 TC ctt**, **Df Z1 TT tcc**, **Df Z2 TT tcc**, **Df Z1 TT ctt**, **Df Z2 TT ctt**, **Df Z1 CT tct**, **Df Z2 CT tct**, **Df Z1 CC ttt**, **Df Z2 CC ttt**, **Df Z1 CC tct**, **Df Z2 CC tct**, **Df Z2 TC tct**, **Df Z1 TC tct**, **Df Z1 TC ttt**, **Df Z2 TC ttt**, **Df Z1 TT ttt**, **Df Z2 TT ttt**, **Df Z2 TT tct** y **Df Z1 TT tct**. Estos conformeros están listados en orden de estabilidad decreciente (las estructuras de los conformeros mencionados se encuentran en el **Anexo A**).

De los conformeros hallados, solo nueve han sido descritos previamente por otros autores para pelargonidina: **Pg P CT d**, **Pg P CT u**, **Pg P CC d**, **Pg P CC u**, **Pg Z1 CT d**, **Pg Z1 CC d**, **Pg Z2 CC d**, **Pg Z1 TC u** y **Pg Z1 TT u** (Sakata *et al.*, 2006; Estévez & Mosquera, 2009; Guzmán *et al.*, 2009; Ekanayake *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Cacelli *et al.*, 2016; Dimitrić Marković *et al.*, 2017; Ali & Ali, 2018; Sinopoli *et al.*, 2019). En el caso de cianidina, seis conformeros habían sido informados previamente: **Cn P CT ct A**, **Cn P CC ct A**, **Cn P CT tt A**, **Cn Z1 CT ct A**, **Cn Z1 TC tc A**, y **Cn Z1 TT ct A** (Borkowski *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 2006; Estévez & Mosquera, 2009; Guzmán *et al.*, 2009; Ekanayake *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Cacelli *et al.*, 2016; Ali & Ali, 2018; Sinopoli *et al.*, 2019). Para delfinidina, seis conformeros fueron descritos anteriormente: **Df P CT ctt**, **Df P CC ctt**, **Df P CT tcc**, **Df P CC tcc**, **Df Z1 CT ctt**, y **Df Z1 TT ctt** (Sakata *et al.*, 2006; Estévez & Mosquera, 2008, 2009; Guzmán *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014; Cacelli *et al.*, 2016; Dimitrić Marković *et al.*, 2017; Ali & Ali, 2018; Sinopoli *et al.*, 2019).

En cuanto a las antocianidinas metoxiladas, se identificaron cuarenta conformeros de mínima energía para peonidina: **Pn P CT tc B**, **Pn P CT tc A**, **Pn P CC tc A**, **Pn P CC tc B**, **Pn Z1 CT tc A**, **Pn Z2 CT tc A**, **Pn Z1 CC tc A**, **Pn Z2 CC tc A**, **Pn Z1 CT tc B**, **Pn Z2 CT tc B**, **Pn Z1 CC tc B**, **Pn Z2 CC tc B**, **Pn P CT tt A**, **Pn P CC tt A**, **Pn P CT tt B**, **Pn P CC tt B**, **Pn Z1 TC tc A**, **Pn Z2 TC tc A**, **Pn Z2 TC tc B**, **Pn Z1 TC tc B**, **Pn Z1 TT tc A**, **Pn Z2 TT tc A**, **Pn Z2 CT tt A**, **Pn Z1 CT tt A**, **Pn Z1 TT tc B**, **Pn Z2 TT tc B**, **Pn Z1 CT tt B**, **Pn Z2 CT tt B**, **Pn Z1 CC tt A**, **Pn Z2 CC tt A**, **Pn Z2 CC tt B**, **Pn Z1 CC tt B**, **Pn Z1 TC tt A**, **Pn Z2 TC tt A**, **Pn Z2 TC tt B**, **Pn Z1 TC tt B**, **Pn Z1 TT tt A**, **Pn Z2 TT tt A**, **Pn Z1 TT tt B** y **Pn Z2 TT tt B**. Para petunidina, se encontraron treinta y seis conformeros: **Pt P CT ctt A**, **Pt P CC ctt A**, **Pt P CT ctt B**, **Pt P CC ctt B**, **Pt Z2 CT ctt A**, **Pt Z1 CT ctt A**, **Pt Z2 CT ctt B**, **Pt Z1 CT ctt B**, **Pt Z1 CC ctt B**, **Pt Z2 CC ctt B**, **Pt Z1 CC ctt A**, **Pt Z2 CC ctt A**, **Pt P CT ttt A**, **Pt P CT ttt B**, **Pt P CC ttt A**, **Pt P CT tct B**, **Pt P CC ttt B**, **Pt P CC tct A**, **Pt P CC tct A**, **Pt Z1 CT ttt A**, **Pt Z2 CT ttt A**, **Pt Z1 CT ttt B**, **Pt Z2 CT ttt B**, **Pt Z2 CC ttt A**, **Pt Z1 CC ttt A**, **Pt Z1 CT tct A**, **Pt Z2 CT tct A**, **Pt Z1 CC ttt B**, **Pt Z2 CC ttt B**, **Pt Z1 CT tct B**, **Pt Z2 CT tct B**, **Pt Z2 CC tct A**, **Pt Z1 CC tct A**, **Pt Z2 CC tct B** y **Pt Z1 CC tct B**. Finalmente, para malvidina, se identificaron veinte conformeros: **Mv P CT ttt**, **Mv P CC ttt**, **Mv P CT tct**, **Mv P CC tct**, **Mv Z1 CT tct**, **Mv Z2 CT tct**, **Mv Z1 CT ttt**, **Mv Z2 CT ttt**, **Mv Z2 CC tct**, **Mv Z1 CC tct**, **Mv Z1 CC ttt**, **Mv Z2 CC ttt**, **Mv Z1 TC tct**, **Mv Z2 TC tct**, **Mv Z1 TC ttt**, **Mv Z2 TC ttt**, **Mv Z1 TT tct**, **Mv Z2 TT tct**, **Mv Z1 TT ttt** y **Mv Z2 TT ttt**. Todos estos conformeros están respaldados por la ausencia de frecuencias imaginarias y están listados en orden de estabilidad decreciente (las estructuras de los conformeros mencionados se encuentran en el **Anexo A**).

De los conformeros encontrados para las antocianidinas metoxiladas, sólo cinco han sido descritos anteriormente para peonidina: **Pn P CT tc B**, **Pn P CT tc A**, **Pn P CC tc A**, **Pn P CC tt A**, y **Pn Z1 TT tt B** (Estévez & Mosquera, 2009; Guzmán *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014; Ali & Ali, 2018; Rajan *et al.*, 2018; Sinopoli *et al.*, 2019). Para petunidina, sólo se informaron dos previamente: **Pt P CC ctt A**, y **Pt P CC ttt A** (Estévez & Mosquera, 2009; Lu *et al.*, 2014; Ali & Ali, 2018; Rajan *et al.*, 2019), mientras que, para malvidina, únicamente se había descrito **Mv P CC tct** (Estévez & Mosquera, 2009; Guzmán *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014; Dimitrić Marković *et al.*, 2017; Ali & Ali, 2018; Sinopoli *et al.*, 2019).

5.5.1. *Poblaciones relativas y aspectos estructurales generales en vacío*

El estudio del espacio conformacional de las antocianidinas permite obtener información crucial sobre la energía relativa de los diferentes conformeros y su influencia en las poblaciones relativas. En este contexto, se evaluaron las energías electrónicas (ΔE) y las energías libres de Gibbs (ΔG) de los conformeros más estables de cada antocianidina, y se calcularon las poblaciones relativas de los mismos utilizando la distribución de Maxwell-Boltzmann a 298,15 K (ver **Tablas B1-B6** en **Anexo B**). Los resultados obtenidos para los principales conformeros ($\Delta E < 3$ Kcal/mol) se presentan en la **Tabla 5.1**, mientras que los conformeros más estables, junto con sus posibles interacciones tipo puente de hidrógeno, se muestran en la **Figura 5.30**.

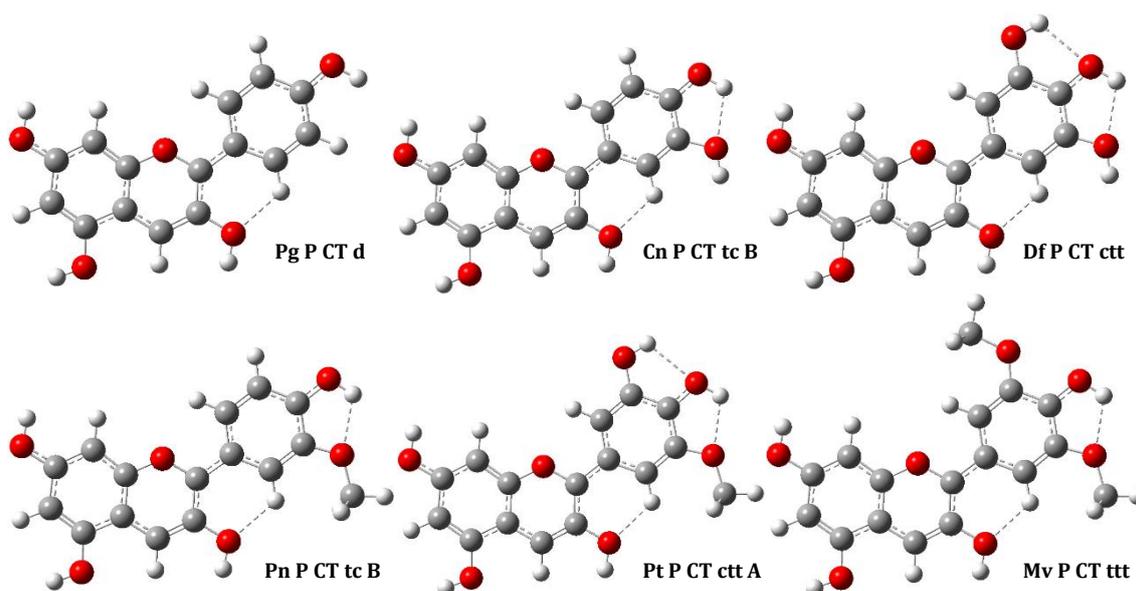


Figura 5.30. Estructuras optimizadas de **Pg P CT d**, **Cn P CT tc B**, **Df P CT ctt**, **Pn P CT tc B**, **Pt P CT ctt A** y **Mv P CT ttt**, con indicación de posibles interacciones tipo puente de hidrógeno en línea punteada.

Tabla 5.1. Diferencias de energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al conformero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes conformeros de pelargonidina.

Antocianidina	ΔE	ΔG	Poblacion Relativa E (%)	Poblacion Relativa G (%)
Pelargonidina^(a)				
<i>Pg P CT d</i>	0,00	0,00	35,25	35,14
<i>Pg P CT u</i>	0,22	0,15	24,52	27,40
<i>Pg P CC d</i>	0,38	0,42	18,71	17,30
<i>Pg P CC u</i>	0,44	0,39	16,83	18,07
<i>Pg Z1 CT d</i>	2,27	2,75	0,77	0,34
<i>Pg Z2 CT d</i>	2,27	2,75	0,77	0,34
<i>Pg Z1 CT u</i>	2,31	2,80	0,71	0,31
<i>Pg Z2 CT u</i>	2,31	2,80	0,71	0,31
$\Sigma PR P_g P^{(a)}$			95,32	97,91
$\Sigma PR P_g Z^{(a)}$			4,68	2,09
Cianidina^(b)				

<i>Cn P CT tc B</i>	0,00	0,00	21,01	19,74
<i>Cn P CT ct A</i>	0,03	0,05	19,90	18,15
<i>Cn P CT tc A</i>	0,30	0,23	12,76	13,48
<i>Cn P CC tc B</i>	0,38	0,42	11,12	9,69
<i>Cn P CC tc A</i>	0,43	0,49	10,12	8,66
<i>Cn P CC ct A</i>	0,54	0,58	8,50	7,43
<i>Cn P CT ct B</i>	0,70	0,25	6,48	13,00
<i>Cn P CC ct B</i>	1,01	0,79	3,80	5,20
<i>Cn Z1 CT ct A</i>	1,97	2,62	0,75	0,24
<i>Cn Z2 CT ct A</i>	1,97	2,62	0,75	0,24
<i>Cn Z1 CT ct B</i>	2,17	2,83	0,54	0,17
<i>Cn Z2 CT ct B</i>	2,17	2,83	0,54	0,17
<i>Cn Z2 CT tc A</i>	2,35	2,90	0,40	0,15
<i>Cn Z1 CT tc A</i>	2,35	2,90	0,40	0,15
<i>Cn Z1 CC ct A</i>	2,41	3,02	0,36	0,12
<i>Cn Z2 CC ct A</i>	2,41	3,02	0,36	0,12
<i>Cn Z1 CC ct B</i>	2,48	3,12	0,32	0,10
<i>Cn Z2 CC ct B</i>	2,48	3,12	0,32	0,10
<i>Cn Z1 CC tc A</i>	2,50	3,04	0,31	0,12
<i>Cn Z2 CC tc A</i>	2,50	3,04	0,31	0,12
<i>Cn Z2 CT tc B</i>	2,53	3,05	0,29	0,11
<i>Cn Z1 CT tc B</i>	2,53	3,05	0,29	0,11
<i>Cn Z1 CC tc B</i>	2,88	3,37	0,16	0,07
<i>Cn Z2 CC tc B</i>	2,88	3,37	0,16	0,07
Σ PR Cn P^(a)			93,72	95,39
Σ PR Cn Z^(a)			6,28	4,61
<i>Delfinidina</i>^(c)				
<i>Df P CT ctt</i>	0,00	0,00	48,75	47,83
<i>Df P CC ctt</i>	0,51	0,52	20,78	19,98
<i>Df P CT tcc</i>	0,79	0,77	12,90	14,32
<i>Df P CC tcc</i>	0,94	0,88	9,90	10,90
<i>Df Z1 CT tcc</i>	2,18	2,77	1,22	0,45
<i>Df Z2 CT tcc</i>	2,18	2,77	1,22	0,45
<i>Df Z2 CT ctt</i>	2,23	2,79	1,14	0,43
<i>Df Z1 CT ctt</i>	2,23	2,79	1,13	0,43
<i>Df Z1 CC tcc</i>	2,37	2,93	0,89	0,34
<i>Df Z2 CC tcc</i>	2,37	2,93	0,89	0,34
<i>Df Z1 CC ctt</i>	2,67	3,18	0,54	0,22
<i>Df Z2 CC ctt</i>	2,67	3,18	0,54	0,22
Σ PR Df P^(a)			92,41	93,12
Σ PR Df Z^(b)			7,59	6,88
<i>Peonidina</i>^(d)				
<i>Pn P CT tc B</i>	0,00	0,00	31,17	35,51
<i>Pn P CT tc A</i>	0,14	0,22	24,74	25,89
<i>Pn P CC tc A</i>	0,20	0,41	22,23	18,63
<i>Pn P CC tc B</i>	0,36	0,49	16,90	16,53
<i>Pn Z1 CT tc A</i>	2,18	3,06	0,78	0,21
<i>Pn Z2 CT tc A</i>	2,18	3,06	0,78	0,21
<i>Pn Z1 CC tc A</i>	2,28	3,14	0,66	0,19

<i>Pn Z2 CC tc A</i>	2,28	3,14	0,66	0,19
<i>Pn Z1 CT tc B</i>	2,29	3,13	0,66	0,19
<i>Pn Z2 CT tc B</i>	2,29	3,13	0,66	0,19
<i>Pn Z1 CC tc B</i>	2,65	3,45	0,36	0,11
<i>Pn Z2 CC tc B</i>	2,65	3,45	0,36	0,11
Σ PR Pn P^(a)			95,08	96,59
Σ PR Pn Z^(b)			4,92	3,41
Petunidina^(c)				
<i>Pt P CT ctt A</i>	0,00	0,00	41,40	41,51
<i>Pt P CC ctt A</i>	0,42	0,44	20,38	20,42
<i>Pt P CT ctt B</i>	0,64	0,33	14,11	14,14
<i>Pt P CC ctt B</i>	0,64	0,55	13,99	14,02
<i>Pt Z2 CT ctt A</i>	1,91	2,59	1,66	1,69
<i>Pt Z1 CT ctt A</i>	1,91	2,59	1,66	1,69
<i>Pt Z2 CT ctt B</i>	2,00	2,72	1,41	1,41
<i>Pt Z1 CT ctt B</i>	2,00	2,71	1,41	1,41
<i>Pt Z1 CC ctt B</i>	2,15	2,84	1,11	1,09
<i>Pt Z2 CC ctt B</i>	2,15	2,84	1,11	1,09
<i>Pt Z1 CC ctt A</i>	2,36	3,00	0,77	0,78
<i>Pt Z2 CC ctt A</i>	2,36	3,00	0,77	0,78
Σ PR Pt P^(a)			90,08	90,27
Σ PR Pt Z^(b)			9,92	9,73
Malvidina^(d)				
<i>Mv P CT ttt</i>	0,00	0,00	32,70	33,41
<i>Mv P CC ttt</i>	0,17	0,25	24,38	23,10
<i>Mv P CT tct</i>	0,29	0,26	19,98	22,86
<i>Mv P CC tct</i>	0,38	0,45	17,21	16,48
<i>Mv Z1 CT tct</i>	2,19	2,83	0,82	0,30
<i>Mv Z2 CT tct</i>	2,19	2,83	0,82	0,30
<i>Mv Z1 CT ttt</i>	2,19	2,82	0,81	0,30
<i>Mv Z2 CT ttt</i>	2,19	2,82	0,81	0,30
<i>Mv Z2 CC tct</i>	2,32	2,95	0,65	0,24
<i>Mv Z1 CC tct</i>	2,32	2,95	0,65	0,24
<i>Mv Z1 CC ttt</i>	2,39	2,99	0,58	0,23
<i>Mv Z2 CC ttt</i>	2,39	2,99	0,58	0,23
Σ PR Mv P^(a)			94,28	95,85
Σ PR Mv Z^(b)			5,72	4,15

^(a) **Pg P CT d**: E = -598730,45 kcal/mol; G = -598758,26 kcal/mol; ^(b) **Cn P CT tc B**: E = -645946,97 kcal/mol; G = -645975,71 kcal/mol; ^(c) **Df P CT ctt**: E = -693163,29 kcal/mol; G = -693192,83 kcal/mol; ^(d) **Pn P CT tc B**: E = -670597,97 kcal/mol; G = -670628,24 kcal/mol; ^(e) **Pt P CT ctt A**: E = -717814,12 kcal/mol; G = -717845,02 kcal/mol; ^(f) **Mv P CT ttt B**: E = -742460,59 kcal/mol; G = -742492,74 kcal/mol; ^(g) Suma de las poblaciones relativas de los conformeros tipo **P** (%); ^(h) Suma de las poblaciones relativas de los conformeros tipo **Z** (%).

Para pelargonidina, el conformero más estable fue **Pg P CT d** (Figura 5.30). Al modificar la disposición de los sustituyentes en el anillo A para obtener el conformero **Pg P CC d**, se observó un incremento en los valores de ΔE y ΔG de 0,38 kcal/mol y 0,42 kcal/mol respectivamente, lo que indica una menor estabilidad. En los conformeros no planos, los aumentos en E y G oscilaron entre 2,09 y 2,27 kcal/mol para E y entre 2,66 y 2,75 kcal/mol para G, en comparación con sus análogos planos. Ejemplos de esto incluyen

los confórmeros **Pg Z1 CT d** y **Pg Z2 CT d** en comparación con **Pg P CC d**, y **Pg Z1 CC d** y **Pg Z2 CC d** en relación con **Pg P CT d**, entre otros.

En el caso de cianidina, el confórmero más estable fue **Cn P CT tc B** (Figura 5.30). Al modificar la conformación hacia **Cn P CC tc B**, se observó un aumento de energía similar al descrito para pelargonidina, con un ΔE de 0,38 kcal/mol y un ΔG de 0,42 kcal/mol. Para los confórmeros no planos, los incrementos en E y G variaron entre 1,47 y 2,53 kcal/mol para E y entre 2,33 y 3,05 kcal/mol para G, en comparación con los confórmeros planos. La mayor variabilidad observada en cianidina respecto a pelargonidina podría deberse a un mayor grado de sustitución, lo que permite una estabilización más efectiva a través de interacciones intramoleculares.

En el caso de delphinidina, el confórmero más estable fue **Df P CT ctt** (Figura 5.30). El confórmero **Df P CC ctt** presentó un ΔE de 0,51 kcal/mol y un ΔG de 0,52 kcal/mol, lo que indica un incremento de energía similar al observado en los otros compuestos. En los confórmeros no planos, los aumentos en E oscilaron entre 1,40 y 2,47 kcal/mol, mientras que para G variaron entre 2,06 y 2,95 kcal/mol, en comparación con los confórmeros planos.

Al analizar la antocianidina metoxilada más simple, peonidina, el confórmero más estable fue **Pn P CT tc B** (Figura 5.30). Al modificar la disposición de los sustituyentes del anillo A, se observó un incremento en los valores de ΔE y ΔG de 0,36 kcal/mol y 0,49 kcal/mol respectivamente, para el confórmero **Pn P CC tc B**. En los confórmeros no planos, los aumentos en E variaron entre 2,05 y 2,16 kcal/mol, y en G entre 2,73 y 2,93 kcal/mol.

Siguiendo con el análisis para petunidina, el confórmero más estable fue **Pt P CT ctt A** (Figura 5.30). El confórmero **Pt P CC ctt A** presentó un ΔE de 0,42 kcal/mol y un ΔG de 0,44 kcal/mol, lo que indica un aumento de energía similar al observado en los otros compuestos. En los confórmeros no planos, los incrementos en E variaron entre 1,94 y 2,24 kcal/mol, mientras que para G fluctuaron entre 2,56 y 2,95 kcal/mol, en comparación con los confórmeros planos.

Por último, para malvidina, el confórmero más estable fue **Mv P CT ttt** (Figura 5.30). Al analizar el confórmero **Mv P CC ttt**, se observó un incremento de energía menor en comparación con los otros compuestos, con un ΔE de 0,17 kcal/mol y un ΔG de 0,25 kcal/mol. En los confórmeros no planos, los incrementos en E oscilaron entre 1,89 y 2,22 kcal/mol, mientras que los aumentos en G variaron entre 2,50 y 2,82 kcal/mol.

En resumen, la variación en las energías de los confórmeros de cianidina fue mayor que en pelargonidina, lo que sugiere que un mayor grado de sustitución en el anillo B tiende a estabilizar algunas estructuras no planas. Un comportamiento similar se observó en delphinidina, donde las diferencias de energía entre los confórmeros planos y no planos fueron mayores que para pelargonidina. En cambio, en las antocianidinas metoxiladas, estos rangos de variación energética fueron más acotados. El incremento de energía al pasar de un confórmero plano a su análogo no plano se mantuvo relativamente constante para las tres antocianidinas metoxiladas. Estos cambios en la energía demuestran no sólo la relevancia del patrón de sustitución en el anillo B, sino también la orientación espacial de los sustituyentes en la estructura de la antocianidina, particularmente en los anillos A y

C. Además, se observó una marcada estabilidad en las estructuras planas, la cual está asociada a una mayor deslocalización del sistema electrónico π y a efectos de conjugación.

En el caso de pelargonidina, se identificaron sólo cuatro estructuras planas de un total de veinte conformeros. No obstante, estas estructuras planas representaron el 95% de la población relativa (**Tabla 5.1**), según la distribución de Maxwell-Boltzmann basada en ΔE . El conformero más abundante, **P CT d**, contribuyó con el 35% de la población relativa total (**Tabla 5.1**). Para cianidina, que presentó un total de sesenta conformeros, y delfinidina, con treinta y siete conformeros, las estructuras planas representaron sólo doce y siete conformeros respectivamente. Sin embargo, la población relativa de los conformeros planos fue del 94% para cianidina y del 92% para delfinidina (**Tabla 5.1**). Los conformeros más abundantes fueron **P CT tc B** en cianidina, con una contribución del 21%, y **P CT ctt** en delfinidina, que aportó el 49% de la población relativa total (**Tabla 5.1**). En cuanto a peonidina, que presentó un total de cuarenta conformeros en su espacio conformacional, sólo siete de ellos eran planos, lo que representa el 95% del espacio conformacional predominando cuatro en este porcentaje (**Tabla 5.1**). El conformero más abundante, **Pn P CT tc B**, representó casi un tercio del espacio conformacional, con un 31% (**Tabla 5.1**). En petunidina, se identificaron doce estructuras planas de un total de treinta y seis conformeros, representando un 90% del total (**Tabla 5.1**), similar a lo observado en peonidina, siendo cuatro estructuras las principales contribuyentes. El conformero más abundante fue **Pt P CT ctt A**, que representó el 41% de todo el espacio conformacional (**Tabla 5.1**). Por último, para malvidina, de los veinte conformeros encontrados, sólo cuatro eran estructuras planas, representando el 94% del espacio conformacional (**Tabla 5.1**). El conformero más abundante fue **Mv P CT ttt**, que contribuyó con el 32% de la población relativa (**Tabla 5.1**).

Además, los conformeros de tipo **CT** mostraron una mayor abundancia relativa que los de tipo **CC**. En pelargonidina, los conformeros **CT** representaron el 63% del total, mientras que en cianidina y delfinidina, el 64% y el 66% respectivamente. Para peonidina, los conformeros **CT** representaron el 59% del total, mientras que en petunidina y malvidina el 62% y el 56% respectivamente. En contraste, los conformeros **CC** contribuyeron con el 37%, 36%, 34%, 41%, 38% y 44% del total en pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina respectivamente (**Tabla 5.1**).

Este análisis muestra que las antocianidinas que contienen dos o tres grupos hidroxilo en el anillo B (cianidina, delfinidina y petunidina) presentan una mayor contribución de los conformeros **CT** en su espacio conformacional. Este comportamiento podría asociarse con efectos de estabilización relacionados con el anillo B. Por ejemplo, al considerar los ΔE entre los conformeros **CT** y **CC** más estables discutidos anteriormente, se observa que peonidina y malvidina presentan los menores valores de diferencia energética, mientras que delfinidina y petunidina muestran los mayores ΔE . Esto indica que las energías de los conformeros más estables para peonidina y malvidina se encuentran en un rango más acotado, lo que se refleja en valores similares en las contribuciones a las poblaciones relativas de cada compuesto. Estos resultados sugieren que los efectos estabilizantes que dominan el espacio conformacional de estos compuestos no están asociados únicamente al anillo A, sino que dependen en gran medida de los efectos presentes en el anillo B.

A lo largo de todo el análisis, no se detectaron variaciones significativas entre los valores de ΔE y ΔG , lo que indica que las tendencias de estabilidad se mantuvieron constantes en cada confórmero. Esto refuerza la conclusión de que la orientación **CT** de los sustituyentes en el anillo A proporciona la mayor estabilidad a las antocianidinas estudiadas. Por tanto, las disposiciones **CT** resultaron ser más estables que las **CC**, como ya se ha descrito previamente para otros flavonoides, como las catequinas y procianidinas (Bentz *et al.*, 2014a, 2014b, 2016, 2017; Lobayan *et al.*, 2020).

En cianidina, las tres primeras estructuras corresponden a disposiciones **CT** en el anillo A. Dentro del anillo B, las disposiciones más favorables fueron **tc B**, **ct A** y **tc A**, que se repitieron en las estructuras siguientes, pero con disposición **CC** en el anillo A. Los confórmeros menos estables presentaron disposiciones **tt** en el anillo B, tanto en los confórmeros del tipo A como B. Vemos entonces que la disposición coordinada y horaria de los grupos HO-5 y HO-7 del anillo A dominan la estabilidad global de la molécula para cianidina, mientras que los arreglos **tt** del anillo B (HO-3' y HO-4') aumentan la energía global de la molécula.

En delfinidina, el confórmero más estable también mostró una disposición **CT** en el anillo A, al igual que en los otros compuestos. La presencia de tres grupos hidroxilo en el anillo B resultó clave para la estabilidad global de la molécula, como se describió previamente. Las disposiciones **ctt** en el anillo B fueron las más estables, seguidas por las **tcc**, manteniendo el patrón de estabilidad **CT** > **CC** en el anillo A. Por lo tanto, para delfinidina, los tres grupos hidroxilos del anillo B (HO-3', HO-4' y HO-5') modulan la estabilidad global de la molécula, siendo la disposición horaria **ctt** la que brinda mayor estabilidad, indistintamente a la disposición de los grupos HO-5 y HO-7 del anillo A.

En el caso de peonidina, los dos conformeros más estables también presentaron una disposición **CT** en el anillo A. El grupo metoxilo (H₃CO-3') voluminoso en el anillo B condiciona la disposición de los demás sustituyentes. Por esta razón, la disposición más favorable para este anillo es del tipo **tc**. Un comportamiento similar se observa en petunidina, donde la disposición más favorable en el anillo B es del tipo horaria **ctt**, con el grupo metoxilo (H₃CO-5') orientado en dirección opuesta a los dos grupos hidroxilo (HO-3', HO-4'). Como se discutió anteriormente, la estabilización resultante de la disposición coordinada en el anillo B es un factor determinante para la estabilidad global de la molécula. Por ello, en petunidina se observa una alternancia en los confórmeros más estables entre arreglos horarios **CT** y no coordinados **CC** en el anillo A, lo que sugiere una menor influencia de estos arreglos en los efectos estabilizantes.

Finalmente, en malvidina también se observa una alternancia entre las disposiciones **CT** y **CC** en los confórmeros más estables. La disposición **ttt** en el anillo B proporciona una mayor estabilización en comparación con la disposición **tct**. De esta forma, los dos confórmeros más estables en malvidina presentan la disposición **ttt** en el anillo B.

Como conclusión preliminar, en el caso de pelargonidina, la disposición espacial del único sustituyente en el anillo B (HO-4') no es el principal factor que define la estabilidad global de la molécula. En su lugar, los sustituyentes en el anillo A tienen un papel más relevante. En contraste, en cianidina y delfinidina, que poseen dos y tres sustituyentes en el anillo B respectivamente, la disposición espacial de estos grupos es crucial para la estabilidad general de estos compuestos. Esto demuestra que los efectos

estereoelectrónicos del anillo B tienen mayor peso que los efectos asociados a los sustituyentes del anillo A cuando hay un patrón de di- o trisustitución en el anillo B. Estos efectos se acentúan aún más cuando se incorporan sustituyentes voluminosos, como los grupos metoxilo, en peonidina, petunidina y malvidina.

Estas características intrínsecas, que no habían sido informadas previamente, fueron reveladas gracias a la exploración detallada del espacio conformacional de estos compuestos.

5.5.2. *Espacio conformacional en solventes*

El estudio del espacio conformacional en vacío proporciona información fundamental sobre la estabilidad intrínseca de las antocianidinas, permitiendo identificar las conformaciones más estables en ausencia de influencias externas. Sin embargo, para establecer una correlación más precisa entre estas conformaciones y la actividad biológica, es esencial considerar el entorno en el que estas moléculas se encuentran en condiciones fisiológicas. Los solventes, como el agua, el metanol y el ácido acético, pueden influir significativamente en la estabilidad relativa de los diferentes conformeros, modificando la energía y la geometría molecular a través de interacciones con el medio.

El análisis conformacional en solventes es un complemento necesario al estudio en vacío, ya que permite simular mejor el comportamiento de estas moléculas en entornos biológicos, donde las interacciones solvente-soluto juegan un papel crucial. La inclusión de solventes en el estudio no sólo ayuda a predecir la estabilidad de los conformeros en condiciones más realistas, sino que también aporta información clave para comprender las propiedades bioactivas de las antocianidinas en escenarios cercanos a los biológicos. Estas interacciones pueden alterar la distribución de las poblaciones conformacionales, afectando la deslocalización electrónica, la estabilidad del sistema π y la formación de puentes de hidrógeno.

De esta manera, el análisis en solventes mejora la relevancia práctica de los resultados obtenidos, proporcionando una visión más completa del comportamiento de las antocianidinas bajo condiciones simuladas similares a las biológicas. Esta aproximación es particularmente valiosa para avanzar en el diseño racional de fármacos y otros compuestos bioactivos derivados de antocianidinas, ya que permite predecir mejor cómo estos compuestos interactuarán en medios acuosos o en presencia de otros solventes relevantes en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas.

Los conformeros seleccionados para cada antocianidina fueron reoptimizados utilizando el mismo nivel teórico, B3LYP/6-311G++(d,p), para evaluar el efecto de los solventes ácido acético, metanol y agua. Las variaciones en el espacio conformacional se presentan en la **Tabla 5.2**.

Para pelargonidina, los cuatro conformeros **P** (planos) mostraron una diferencia de energía (ΔE) menor a 2 Kcal/mol (límite considerado de interconversión entre conformeros) respecto al conformero más estable en cada uno de los tres solventes. En el caso de cianidina, diez conformeros mostraron ΔE menor a 2 Kcal/mol en ácido acético, mientras que sólo ocho alcanzaron esta condición en metanol y agua. Para delfinidina, diez

confórmeros en cada solvente presentaron ΔE menor a 2 Kcal/mol con respecto al confórmero más estable. En peonidina, seis confórmeros cumplieron con esta condición en ácido acético, pero sólo cuatro lo hicieron en metanol y agua. Por su parte, petunidina mostró diez confórmeros con ΔE menor a 2 Kcal/mol en los tres solventes. Finalmente, para malvidina, únicamente los confórmeros **P** (planos) presentaron ΔE menor a 2 Kcal/mol en comparación con el confórmero más estable en cada solvente evaluado.

Tabla 5.2. Diferencia de energías electrónicas (ΔE) y poblaciones relativas (PR) de los confórmeros de pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina, optimizados en solventes (ácido acético, metanol y agua) al nivel teórico B3LYP/6-311++G(d,p).

	ΔE Ácido Acético [a]	ΔE [b]	ΔE Metanol[c]	ΔE [d]	ΔE Agua[e]	ΔE [f]	PR Ácido Acético[g]	PR Metanol[h]	PR Agua[i]
PELARGONIDINA									
<i>Pg P CC d</i>	0,24	10,18	0,20	16,94	0,19	17,88	21,14	21,69	21,38
<i>Pg Z1 CC d</i>	2,48	10,59	2,41	17,38	2,38	18,34	0,48	0,52	0,53
<i>Pg Z2 CC d</i>	2,48	10,58	2,41	17,38	2,38	18,35	0,48	0,52	0,53
<i>Pg P CC u</i>	0,30	10,09	0,27	16,83	0,27	17,78	19,08	19,06	18,75
<i>Pg Z1 CC u</i>	2,53	10,54	2,49	17,30	2,47	18,26	0,44	0,45	0,46
<i>Pg Z2 CC u</i>	2,52	10,54	2,49	17,30	2,47	18,26	0,44	0,45	0,46
<i>Pg P CT d</i>	0,00	9,99	0,00	16,71	0,00	17,65	31,45	30,16	29,63
<i>Pg Z1 CT d</i>	2,32	10,43	2,20	17,27	2,15	18,25	0,63	0,74	0,78
<i>Pg Z2 CT d</i>	2,32	10,42	2,20	17,27	2,15	18,25	0,63	0,74	0,78
<i>Pg P CT u</i>	0,16	9,98	0,13	16,73	0,09	17,71	24,03	24,37	25,33
<i>Pg Z1 CT u</i>	2,35	10,44	2,28	17,24	2,23	18,22	0,60	0,65	0,68
<i>Pg Z2 CT u</i>	2,35	10,44	2,27	17,24	2,23	18,22	0,60	0,65	0,68
$\Sigma PR Pn P^{[j]}$							95,70	95,29	95,09
$\Sigma PR Pn Z^{[k]}$							4,30	4,71	4,91
CIANIDINA									
<i>Cn P CC ct A</i>	0,45	38,43	0,66	45,25	0,69	46,23	8,78	6,81	6,71
<i>Cn Z1 CC ct A</i>	2,17	38,58	2,48	45,30	2,52	46,28	0,48	0,31	0,31
<i>Cn Z2 CC ct A</i>	2,17	38,58	2,48	45,30	2,52	46,28	0,48	0,31	0,31
<i>Cn P CC tc A</i>	0,21	38,56	0,19	45,62	0,21	46,61	13,08	15,06	15,12
<i>Cn Z1 CC tc A</i>	2,28	38,56	2,37	45,50	2,38	46,51	0,40	0,38	0,39
<i>Cn Z2 CC tc A</i>	2,28	38,56	2,37	45,50	2,38	46,51	0,40	0,38	0,39
<i>Cn P CT ct A</i>	0,22	38,15	0,45	44,96	0,49	45,93	12,80	9,72	9,49
<i>Cn Z1 CT ct A</i>	1,92	38,39	2,26	45,09	2,31	46,05	0,73	0,46	0,44
<i>Cn Z2 CT ct A</i>	1,92	38,39	2,26	45,09	2,31	46,05	0,73	0,46	0,44
<i>Cn P CT tc A</i>	0,10	38,53	0,00	45,67	0,00	46,68	15,80	20,67	21,61
<i>Cn Z1 CT tc A</i>	2,11	38,57	2,16	45,56	2,16	46,58	0,53	0,54	0,56
<i>Cn Z2 CT tc A</i>	2,11	38,57	2,16	45,56	2,16	46,58	0,53	0,54	0,56
<i>Cn P CC ct B</i>	0,74	38,61	0,71	45,67	0,84	46,56	5,32	6,19	5,19
<i>Cn Z1 CC ct B</i>	2,68	38,14	2,75	45,10	2,76	46,11	0,20	0,20	0,20
<i>Cn Z2 CC ct B</i>	2,68	38,14	2,75	45,10	2,76	46,11	0,20	0,20	0,20
<i>Cn P CC tc B</i>	0,26	38,45	0,35	45,40	0,36	46,40	12,05	11,47	11,75
<i>Cn Z1 CC tc B</i>	2,66	38,57	2,52	45,73	2,51	46,77	0,21	0,29	0,31
<i>Cn Z2 CC tc B</i>	2,66	38,57	2,52	45,73	2,51	46,77	0,21	0,29	0,31
<i>Cn P CT ct B</i>	0,58	38,45	0,53	45,54	0,57	46,51	7,01	8,39	8,22
<i>Cn Z1 CT ct B</i>	2,39	38,11	2,55	44,99	2,58	45,98	0,33	0,28	0,28

<i>Cn Z2 CT ct B</i>	2,39	38,11	2,55	44,99	2,58	45,98	0,33	0,28	0,28
<i>Cn P CT tc B</i>	0,00	38,34	0,15	45,22	0,18	46,21	18,68	15,96	16,06
<i>Cn Z1 CT tc B</i>	2,33	38,54	2,32	45,58	2,33	46,59	0,36	0,41	0,42
<i>Cn Z2 CT tc B</i>	2,33	38,54	2,32	45,58	2,33	46,59	0,36	0,41	0,42
Σ PR Cn P^{III}							93,51	94,26	94,15
Σ PR Cn Z^{III}							6,49	5,74	5,85
DELFINIDINA									
<i>Df P CC ctt</i>	0,29	38,83	0,22	45,93	0,21	46,95	19,57	19,65	19,86
<i>Df Z1 CC ctt</i>	2,14	39,15	2,13	46,19	2,11	47,21	0,86	0,79	0,79
<i>Df Z2 CC ctt</i>	2,14	39,15	2,13	46,19	2,11	47,21	0,86	0,79	0,79
<i>Df P CC tcc</i>	0,39	39,18	0,27	46,31	0,26	47,33	16,66	17,98	18,06
<i>Df Z1 CC tcc</i>	1,83	39,16	1,88	46,13	1,90	47,12	1,46	1,19	1,13
<i>Df Z2 CC tcc</i>	1,83	39,16	1,88	46,13	1,90	47,12	1,46	1,19	1,13
<i>Df P CT ctt</i>	0,00	38,62	0,00	45,64	0,00	46,65	32,09	28,44	28,14
<i>Df Z1 CT ctt</i>	1,83	39,02	1,89	45,99	1,90	46,98	1,47	1,18	1,14
<i>Df Z2 CT ctt</i>	1,83	39,02	1,89	45,98	1,90	46,98	1,47	1,18	1,14
<i>Df P CT tcc</i>	0,27	39,14	0,10	46,33	0,08	47,36	20,39	24,16	24,55
<i>Df Z1 CT tcc</i>	1,69	39,12	1,66	46,17	1,69	47,14	1,86	1,73	1,62
<i>Df Z2 CT tcc</i>	1,69	39,12	1,66	46,17	1,69	47,15	1,86	1,73	1,62
Σ PR Df P^{III}							88,70	90,22	90,62
Σ PR Df Z^{III}							11,30	9,78	9,38
PEONIDINA									
<i>Pt P CC tc A</i>	0,20	36,59	0,37	43,32	0,34	44,30	21,98	22,57	23,55
<i>Pt Z1 CC tc A</i>	2,12	36,76	2,36	43,41	2,36	44,37	0,87	0,79	0,79
<i>Pt Z2 CC tc A</i>	2,11	36,76	2,36	43,41	2,36	44,37	0,87	0,78	0,79
<i>Pt P CT tc A</i>	0,00	36,72	0,00	43,62	0,00	44,58	30,84	42,20	42,07
<i>Pt Z1 CT tc A</i>	1,85	36,92	2,15	43,52	2,16	44,46	1,37	1,13	1,10
<i>Pt Z2 CT tc A</i>	1,85	36,92	2,14	43,52	2,16	44,46	1,37	1,13	1,10
<i>Pt P CC tc B</i>	0,42	36,53	0,75	43,10	0,74	44,06	15,15	11,95	11,98
<i>Pt Z1 CC tc B</i>	2,52	36,71	2,85	43,28	2,86	44,23	0,44	0,34	0,34
<i>Pt Z2 CC tc B</i>	2,52	36,71	2,85	43,28	2,86	44,23	0,44	0,34	0,34
<i>Pt P CT tc B</i>	0,12	36,47	0,51	42,97	0,54	43,90	25,19	17,71	16,96
<i>Pt Z1 CT tc B</i>	2,21	36,67	2,59	43,18	2,62	44,11	0,74	0,53	0,50
<i>Pt Z2 CT tc B</i>	2,21	36,67	2,59	43,18	2,62	44,11	0,75	0,53	0,50
Σ PR Pn P^{III}							93,16	94,43	94,56
Σ PR Pn Z^{III}							6,84	5,57	5,44
PETUNIDINA									
<i>Pt P CC ctt A</i>	0,32	37,15	0,21	43,84	0,25	44,81	18,77	18,07	18,01
<i>Pt Z1 CC ctt A</i>	2,21	37,20	2,11	43,88	2,17	44,83	0,77	0,73	0,71
<i>Pt Z2 CC ctt A</i>	2,21	37,20	2,12	43,87	2,17	44,83	0,77	0,72	0,71
<i>Pt P CT ctt A</i>	0,00	37,05	0,04	43,59	0,10	44,54	32,18	24,11	23,32
<i>Pt Z1 CT ctt A</i>	1,86	37,10	1,84	43,70	1,91	44,64	1,40	1,16	1,09
<i>Pt Z2 CT ctt A</i>	1,86	37,10	1,84	43,70	1,91	44,63	1,40	1,16	1,09
<i>Pt P CC ctt B</i>	0,30	37,39	0,08	44,20	0,13	45,16	19,29	22,72	22,23
<i>Pt Z1 CC ctt B</i>	1,88	37,32	1,80	43,98	1,89	44,90	1,35	1,23	1,13
<i>Pt Z2 CC ctt B</i>	1,88	37,32	1,80	43,98	1,89	44,90	1,35	1,23	1,13
<i>Pt P CT ctt B</i>	0,29	37,40	0,00	44,27	0,00	45,28	19,65	25,85	27,62
<i>Pt Z1 CT ctt B</i>	1,80	37,25	1,68	43,95	1,74	44,91	1,53	1,51	1,47
<i>Pt Z2 CT ctt B</i>	1,80	37,25	1,68	43,95	1,74	44,90	1,53	1,50	1,47

$\Sigma PR Pt P^{[i]}$							89,89	90,75	91,18
$\Sigma PR Pt Z^{[k]}$							10,11	9,25	8,82
MALVIDINA									
<i>Mv P CC tct</i>	0,38	37,21	0,33	44,24	0,32	45,18	17,65	18,01	17,45
<i>Mv Z1 CC tct</i>	2,32	37,30	2,18	44,13	2,37	45,12	0,78	0,57	0,59
<i>Mv Z2 CC tct</i>	2,32	37,30	2,18	44,13	2,37	45,12	0,78	0,57	0,59
<i>Mv P CC ttt</i>	0,17	37,23	0,11	44,15	0,20	45,11	25,57	21,86	21,72
<i>Mv Z1 CC ttt</i>	2,39	37,36	2,19	44,21	2,36	45,21	0,76	0,57	0,61
<i>Mv Z2 CC ttt</i>	2,39	37,36	2,19	44,21	2,36	45,21	0,76	0,57	0,61
<i>Mv P CT tct</i>	0,29	37,18	0,27	44,33	0,14	45,28	19,52	24,28	23,95
<i>Mv Z1 CT tct</i>	2,19	37,17	2,18	44,15	2,21	45,17	0,78	0,73	0,81
<i>Mv Z2 CT tct</i>	2,19	37,17	2,18	44,15	2,21	45,17	0,78	0,73	0,80
<i>Mv P CT ttt</i>	0,00	37,17	0,00	44,18	0,00	45,15	31,01	30,65	31,27
<i>Mv Z1 CT ttt</i>	2,19	37,19	2,17	44,15	2,22	45,17	0,80	0,72	0,80
<i>Mv Z2 CT ttt</i>	2,19	37,20	2,16	44,15	2,22	45,17	0,81	0,72	0,80
$\Sigma PR Mv P^{[i]}$							93,75	94,81	94,39
$\Sigma PR mv Z^{[k]}$							6,25	5,19	5,61

^[a] Diferencia de energía relativa al conformero más estable en ácido acético (Kcal/mol); ^[b] Diferencia de energía vacío-ácido acético (Kcal/mol); ^[c] Diferencia de energía relativa al conformero más estable en metanol (Kcal/mol); ^[d] Diferencia de energía vacío-metanol (Kcal/mol); ^[e] Diferencia de energía relativa al conformero más estable en agua (Kcal/mol); ^[f] Diferencia de energía vacío-agua (Kcal/mol); ^[g] Población relativa de Boltzmann en ácido acético (%); ^[h] Población relativa de Boltzmann en metanol (%); ^[i] Población relativa de Boltzmann en agua (%); ^[j] Suma de las poblaciones relativas de los conformeros tipo **P** (%); ^[k] Suma de las poblaciones relativas de los conformeros tipo **Z** (%).

Aunque el número de conformeros que cumplen esta condición es reducido, los valores de ΔE sugieren que podrían coexistir a temperatura ambiente. Los conformeros más estables de cada antocianidina en los tres solventes se ilustran en la **Figura 5.31**. Comparado con las optimizaciones en vacío, el conformero más estable de pelargonidina en los tres solventes siguió siendo **Pg P CT d**, aunque su población relativa disminuyó conforme aumentó la polaridad del solvente (ácido acético < metanol < agua). La diferencia energética entre los conformeros **P** (planos) y **Z** (no planos) se mantuvo constante en los tres solventes. La contribución de los conformeros **P** al espacio conformacional fue cercana al 95% en los tres solventes, mientras que en vacío fue de aproximadamente 98%, lo que refleja una ligera estabilización de los conformeros **Z** en solución en comparación con el vacío.

En cianidina, el conformero más estable en ácido acético fue **Cn P CT tc B**, al igual que en vacío, aunque su población relativa disminuyó del 21% en vacío al 19% en ácido acético. En metanol y agua, el conformero más estable fue **Cn P CT tc A**, con poblaciones del 21% y 22% respectivamente. A pesar de este cambio, los conformeros tipo **A** representaron la mayor contribución al espacio conformacional tanto en vacío como en los tres solventes (55%, 56% y 56% en ácido acético, metanol y agua respectivamente).

Para delfinidina, el conformero más estable fue **Df P CT ctt** en vacío y en los tres solventes, aunque su contribución al espacio conformacional se redujo del 48% en vacío a 32%, 28% y 28% en ácido acético, metanol y agua respectivamente. Los arreglos **ctt**, que dominaron en vacío con el 72% del espacio conformacional, se redujeron a 56%, 52% y 21% en los tres solventes respectivamente.

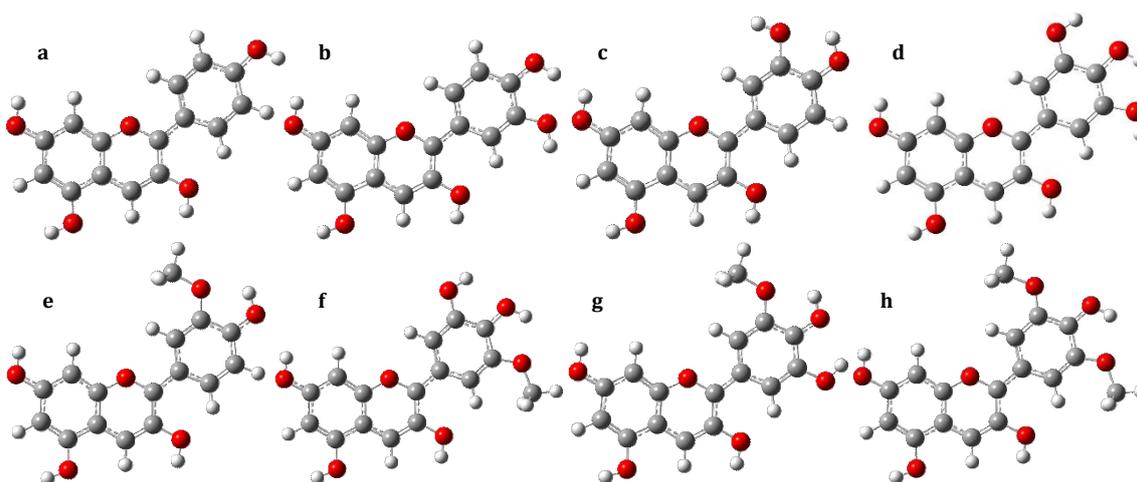


Fig. 5.31. Estructuras optimizadas de los siguientes conformeros de pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina: a) **Pg P CT d** en ácido acético, metanol y agua; b) **Cn P CT tc B** en ácido acético; c) **Cn P CT tc A** en metanol y agua; d) **Df P CT ctt** en ácido acético, metanol y agua; e) **Pn P CT tc A** en ácido acético, metanol y agua; f) **Pt P CT ctt A** en ácido acético; g) **Pt P CT ctt B** en metanol y agua; h) **Mv P CT ttt** en ácido acético, metanol y agua, calculados al nivel teórico B3LYP/6-311G++(d,p).

En el caso de peonidina, el conformero **Pn P CT tc B** fue el más estable en vacío, mientras que en los tres solventes fue **Pn P CT tc A**. La contribución relativa de los cuatro conformeros con $\Delta E < 2$ Kcal/mol mostró que **Pn P CT tc B** y **Pn P CC tc B** disminuyeron su contribución en solución, mientras que **Pn P CT tc A** y **Pn P CC tc A** aumentaron, en función de la polaridad del solvente. Esto indica que la disposición **A** del anillo **B** fue favorecida en los solventes, y los conformeros **P** (planos) se mantuvieron más estables que sus análogos **Z** (no planos).

Para petunidina, el conformero **Pt P CT ctt A** fue el más estable en ácido acético (como en vacío), pero en metanol y agua, **Pt P CT ctt B** fue el más favorecido. Este cambio refleja que, al aumentar la polaridad del solvente, los conformeros **B** se vieron favorecidos sobre los **A**. Finalmente, en malvidina, el conformero más estable en vacío, **Mv P CT ttt**, también fue el más estable en los tres solventes, mostrando que, a mayor polaridad del solvente, se favoreció la estructura **CT** sobre los arreglos **CC** del anillo **A**. Ninguno de los conformeros **Z** (no planos) superó el 2% de contribución en el espacio conformacional en los tres solventes.

Como era previsible, todas las estructuras resultaron ser más estables en solución que en vacío. La diferencia de energía promedio en los diferentes solventes fue la siguiente: para pelargonidina, las energías fueron de 10,35, 17,16 y 18,10 Kcal/mol en ácido acético, metanol y agua respectivamente; para cianidina, 38,43, 45,58 y 46,59 Kcal/mol; para delfinidina, 39,05, 46,10 y 47,10 Kcal/mol; para peonidina, 36,70, 43,32 y 44,26 Kcal/mol; para petunidina, 37,23, 43,91 y 44,86 Kcal/mol; y para malvidina, 37,24, 44,18 y 45,17 Kcal/mol. Estos resultados muestran que, a mayor sustitución en el anillo **B**, ya sea por hidroxilos o metoxilos, mayor es el efecto de estabilización en solventes.

5.6. Conclusiones del Capítulo 5

En este Capítulo se abordó el estudio exhaustivo del espacio conformacional de antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas en vacío y solventes (ácido acético, metanol y agua). Mediante optimizaciones geométricas y análisis de ángulos diedros, se identificaron las conformaciones más estables, destacándose la predominancia de estructuras planas debido a la conjugación entre los anillos, lo que favorece una mayor estabilidad relativa. Sin embargo, se evidenció la complejidad asociada a la caracterización detallada del espacio conformacional, dado el amplio rango de conformaciones posibles y su marcada dependencia de las condiciones experimentales.

La caracterización detallada del espacio conformacional de las antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas permite sentar las bases del estudio de las características topológicas y electrónicas realizado en el Capítulo siguiente. Destacamos la relevancia de conocer e interpretar el espacio conformacional completo, y así aproximarnos al comportamiento de estos compuestos en medios biológicos, donde las diferentes estructuras conformacionales se encuentran en equilibrio.

Capítulo 6. Análisis topológico y electrónico del espacio conformacional de antocianidinas y su relación con bioactividades

6.1. Introducción a la caracterización del espacio conformacional de las antocianidinas

La exploración exhaustiva del espacio conformacional desarrollada en el Capítulo 5, permitió comenzar a entender cómo las diferentes conformaciones coexisten en vacío y solventes, simulando distintos entornos biológicos. Se estudiaron aspectos topológicos como distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros. Este análisis se complementó con un estudio electrónico mediante los métodos de orbitales naturales de enlace (NBOs, *natural bond orbitals*) y átomos en moléculas (AIM, *atoms in molecules*) para caracterizar en detalle los aspectos electrónicos y los enlaces dentro de las estructuras.

Además, se calcularon propiedades clave como la polarizabilidad, el momento dipolar aparente, los orbitales moleculares de frontera como el orbital ocupado de mayor energía (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*) y el orbital desocupado de menor energía (LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) y la contribución atómica a estos orbitales. Estos cálculos se realizaron para cada conformero individual, considerando la contribución del espacio conformacional completo, lo que proporciona una visión integral de cómo estas propiedades influyen en la reactividad y bioactividad de las antocianidinas. El estudio en todo el espacio conformacional es presentado en esta Tesis por primera vez, dado que se obtienen así resultados más próximos a la realidad, sin sesgo alguno. Este enfoque integral no sólo facilita la identificación de las conformaciones más estables, sino que también permite establecer cómo las variaciones en la geometría molecular y las propiedades electrónicas impactan en las propiedades bioactivas, contribuyendo así a un conocimiento más completo de la relación entre estructura y actividad en este importante grupo de compuestos naturales.

6.2. Metodología

Partiendo de las estructuras totalmente optimizadas del Capítulo 5, se calcularon parámetros geométricos clave, como las distancias de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros relevantes para el análisis detallado de la estructura geométrica de cada antocianidina en estudio.

Utilizando la distribución de Maxwell-Boltzmann expresada en la **Ecuación 6.1**, se calcularon los promedios ponderados de cada conformero a fin de determinar su abundancia relativa dentro del espacio conformacional de cada antocianidina.

$$P_i = \frac{\exp\left(\frac{-E_i}{RT}\right)}{\sum_n \exp\left(\frac{-E_n}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde: E_i es la energía del conformero i ; E_n es la energía del conformero n .

Se estimaron tanto el momento dipolar aparente (μ^*) como la polarizabilidad molecular ($\langle\alpha\rangle$) para cada conformero y se calculó el promedio ponderado de estas

propiedades estructurales en todo el espacio conformacional mediante las **Ecuaciones 6.2** y **6.3**, también empleando la distribución de Maxwell-Boltzmann.

$$\mu^* = \frac{\sum_n \mu_n^* \cdot \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)}{\sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 6.2}$$

$$\langle \alpha \rangle = \frac{\sum_n \langle \alpha_n \rangle \cdot \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)}{\sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 6.3}$$

En cuanto al análisis electrónico, se evaluaron los orbitales moleculares de frontera, HOMO y LUMO, así como las diferencias energéticas HOMO-LUMO, junto con la contribución atómica porcentual a estos orbitales. También se determinaron en todo el espacio conformacional con las **Ecuaciones 6.4**, **6.5** y **6.6**.

$$\langle HOMO \rangle = \frac{\sum_n \langle HOMO_n \rangle \cdot \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)}{\sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 6.4}$$

$$\langle LUMO \rangle = \frac{\sum_n \langle LUMO_n \rangle \cdot \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)}{\sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 6.5}$$

$$\langle (LUMO - HOMO) \rangle = \frac{\sum_n \langle (LUMO - HOMO)_n \rangle \cdot \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)}{\sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 6.6}$$

Donde: $HOMO_n$ es la energía del orbital HOMO del conformero n ; E_n es la energía del conformero n ; $LUMO_n$ es la energía del orbital LUMO del conformero n ; $(LUMO-HOMO)_n$ es la diferencia energética entre el orbital LUMO y HOMO del conformero n .

Por último, por el estudio de los Orbitales Naturales de Enlace (NBOs) y la Teoría de tomos en Moléculas (AIM) se realizó una caracterización topológica de los enlaces y la evaluación de la distribución electrónica en cada conformero. Los NBOs se calcularon para identificar y cuantificar, desde el punto de vista de la teoría de perturbaciones de segundo orden, las energías de interacción que favorecen las conformaciones adoptadas teniendo en cuenta los factores electrónicos, como también la evaluación de las distribuciones de cargas naturales (Biegler-König *et al.*, 2001; Weinhold & Landis, 2001).

Un NBO es una región localizada que se encuentra sobre uno o dos centros, correspondiendo a un par libre o a un enlace respectivamente (Reed *et al.*, 1988; Weinhold & Landis, 2001, 2005). A diferencia de los orbitales moleculares, que están deslocalizados por toda la molécula, los NBOs están localizados en áreas específicas. Un NBO puede tener una ocupación máxima cercana a 2 para los orbitales llenos (Lewis) y 0 para los orbitales vacíos (No Lewis). Esta característica permite una comparación directa con lo que sería una estructura ideal de Lewis, donde los orbitales llenos (donantes) incluyen orbitales internos (CR, *Core*), de enlace (BD, *Bonding*) y pares libres (LP, *Lone Pairs*), mientras que los orbitales vacíos (aceptores) corresponden a orbitales antienlazantes (BD*), orbitales no enlazantes desocupados y orbitales de Rydberg (RY*) de capa de valencia extra (Reed *et al.*, 1988; Weinhold & Landis, 2005).

Para dos átomos A y B, un NBO tipo Lewis (Ω_{AB}) se puede describir utilizando Orbitales Naturales Híbridos (NHOs, *Natural Hybrid Orbitals*), h_A y h_B , y sus coeficientes de polarización, c_A y c_B , según la **Ecuación 6.7**. Estos coeficientes determinan la naturaleza del enlace, el cual puede variar de covalente ($c_A \approx c_B$) a iónico ($c_A \gg c_B$). Por otro lado, los orbitales No Lewis (Ω_{AB}^*) se definen a través de la **Ecuación 6.8**.

$$\Omega_{AB} = c_A h_A + c_B h_B \quad \text{Ecuación 6.7}$$

$$\Omega_{AB}^* = c_B h_A - c_A h_B \quad \text{Ecuación 6.8}$$

Cuando ocurre una interacción entre NBOs, se genera una deslocalización electrónica que desvía la estructura de Lewis de su idealidad, lo que resulta en una desestabilización de la molécula. Este fenómeno puede representarse como una interacción donante (i) \rightarrow aceptor (j). La **Figura 6.1** muestra un diagrama que representa los niveles de energía no perturbados ($^{(0)}$, $\epsilon_{j^*}^{(0)}$) de los orbitales $\phi_i^{(0)}$ (donante) y $\phi_{j^*}^{(0)}$ (aceptor), junto con la energía de estabilización ($E^{(2)}$) resultante de la interacción.

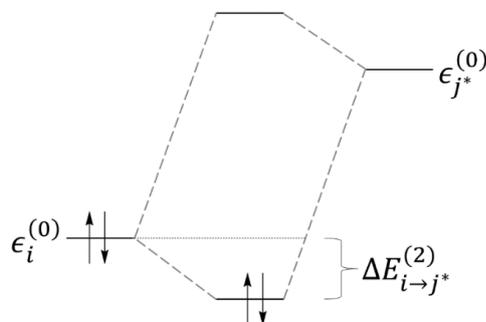


Figura 6.1. Diagrama de orbitales NBOs ($\phi_i^{(0)}$ y $\phi_{j^*}^{(0)}$) y su energía de estabilización según la teoría de perturbaciones de segundo orden.

La energía de estabilización ($E^{(2)}$) se puede calcular usando la teoría de perturbaciones de segundo orden, según la **Ecuación 6.9** (Weinhold & Landis, 2005). En esta ecuación, $^{(0)}$ representa la ocupación del NBO donante, que para el caso ilustrado en la **Figura 6.1** es igual a 2, mientras que \hat{F} es el operador Fock (Weinhold & Landis, 2005).

$$E_{i \rightarrow j^*}^{(2)} = -n_i^{(0)} \frac{\langle \phi_i^{(0)} | \hat{F} | \phi_{j^*}^{(0)} \rangle^2}{\epsilon_{j^*}^0 - \epsilon_i^0} \quad \text{Ecuación 6.9}$$

A modo de ejemplo, se puede describir una transferencia de carga hiperconjugativa desde un par libre de un oxígeno ($1n$ y $2n$) hacia orbitales antienlazantes. La transferencia de energía se representa como $1n \rightarrow \sigma^*$ y $2n \rightarrow \pi^*$ para cada caso, siendo los $1n$ y $2n$ los NBOs donantes (i), y los σ^* y π^* los NBO aceptores (j) (Lobayan *et al.*, 2009, 2012, 2013; Bentz *et al.*, 2010, 2014a, 2014b, 2016, 2017).

En el análisis de las antocianidinas, la comprensión de su estabilidad y reactividad no puede limitarse únicamente al estudio de sus características geométricas, sino que también requiere una evaluación detallada de los enlaces químicos y su distribución electrónica. En este contexto, los estudios AIM permiten caracterizar los enlaces moleculares y sus propiedades topológicas mediante el análisis de la densidad electrónica. AIM complementa de manera efectiva los resultados del análisis NBO, proporcionando una

visión más amplia de la naturaleza de los enlaces de los compuestos. En particular, el análisis de la elipticidad (ϵ) y otros parámetros derivados de la densidad electrónica ofrece una descripción cuantitativa de los enlaces, permitiendo entender la dinámica conformacional y la deslocalización electrónica del conjunto de moléculas en estudio.

La teoría AIM resulta esencial en la química moderna, proporcionando una perspectiva única para caracterizar la estructura y propiedades de las moléculas. A través del análisis de la densidad electrónica, AIM permite dividir un sistema molecular en subsistemas, como los átomos, basándose en criterios físicos precisos. Esta capacidad de descomponer una molécula en función de la densidad electrónica resulta valiosa para relacionar las propiedades de subestructuras moleculares específicas con las propiedades generales de la especie, como la reactividad, la formación de interacciones intermoleculares y propiedades estructurales específicas (Bader, 1990; O'Brien & Popelier, 1999; Popelier *et al.*, 2000; Merino *et al.*, 2005; Stalke, 2011).

Uno de los conceptos fundamentales dentro de AIM es el Punto Crítico de Enlace (BCP, *Bond Critical Point*), que proporciona información detallada sobre los enlaces químicos en términos de la densidad electrónica y su curvatura. En este marco, la elipticidad (ϵ), definida como $(\lambda_1 / \lambda_2 - 1)$, donde λ_1 y λ_2 son los valores propios del Hessiano de la densidad electrónica en el BCP, surge como un parámetro crucial para caracterizar tanto la naturaleza como el orden de los enlaces químicos (Bader, 1998, 2009). La elipticidad ofrece una medida de la distribución espacial de la densidad electrónica alrededor del enlace, proporcionando información sobre su geometría y carácter químico, lo cual es útil para diferenciar entre enlaces simples, dobles y triples. En un enlace simple, la elipticidad tiende a ser cercana a cero ($\lambda_1 \approx \lambda_2$), lo que indica una sección transversal cilíndrica. Sin embargo, en los enlaces dobles y triples, la sección transversal es más elíptica, lo que se refleja en valores de ϵ más elevados para los enlaces dobles y, paradójicamente, en valores menores para los triples.

Estudios previos han demostrado que la elipticidad de los enlaces C-C se correlaciona de manera lineal con parámetros como la longitud del enlace y el índice de deslocalización de dos centros (Matta *et al.*, 2003). Es decir que, ϵ no sólo caracteriza el tipo de enlace, sino que también brinda información cuantitativa sobre la contribución de los electrones π al enlace, reflejando de manera numérica el orden del enlace según la teoría AIM. Debido a que ϵ es un parámetro derivado de la densidad electrónica, su aplicación es universal, lo que permite caracterizar enlaces de cualquier naturaleza (covalentes, iónicos, etc.), convirtiéndolo en una herramienta versátil para estudiar diversos sistemas moleculares.

La elipticidad (ϵ) también complementa otros parámetros derivados de la densidad electrónica, como el Laplaciano de la densidad electrónica ($\nabla^2\rho_{\text{BCP}}$). Mientras que el Laplaciano es útil para diferenciar entre enlaces covalentes y de capa cerrada, la elipticidad proporciona detalles adicionales sobre la geometría y la distribución electrónica a lo largo del enlace. Por lo tanto, la teoría AIM, y en particular el análisis de ϵ en los BCPs, es una metodología robusta para la caracterización detallada de los enlaces químicos, estableciendo un vínculo entre las técnicas teóricas y experimentales avanzadas que facilita la interpretación y predicción de las propiedades químicas de las especies estudiadas.

6.3. Propiedades moleculares en el espacio conformacional

El estudio de propiedades moleculares como el momento dipolar y la polarizabilidad es esencial para comprender el comportamiento electrónico de las antocianidinas, especialmente en su interacción con medios biológicos y su potencial uso en aplicaciones farmacéuticas. Estas propiedades brindan información clave sobre cómo las moléculas responden a campos eléctricos externos, cómo se distribuye la carga en su estructura y cómo interactúan con su entorno. El momento dipolar es un indicador directo de la distribución asimétrica de carga en una molécula, mientras que la polarizabilidad mide la capacidad de la molécula para deformar su nube electrónica bajo la influencia de un campo externo, lo cual es crítico en interacciones como puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals.

Tradicionalmente, el cálculo de estas propiedades moleculares se realiza considerando únicamente el conformero más estable de la molécula, asumiendo que dicho conformero representa adecuadamente el comportamiento global de la misma. Sin embargo, esta aproximación puede ser insuficiente cuando se trata de moléculas flexibles o con múltiples conformaciones estables, como es el caso de las antocianidinas. En estos casos, es importante tener en cuenta todo el espacio conformacional, que abarca una serie de estructuras con energías similares, pero con geometrías distintas, que podrían tener un impacto significativo en las propiedades moleculares.

Al realizar el análisis del momento dipolar y la polarizabilidad en todo el espacio conformacional, se consideran las contribuciones de todos los conformeros, no sólo del más estable. De esta manera, se puede determinar cómo varían estas propiedades entre los conformeros y cómo la contribución ponderada de cada uno afecta los valores promedio en condiciones reales. Esta aproximación es relevante para prever el comportamiento de las moléculas en sistemas dinámicos, como en medios biológicos, donde las interacciones y el entorno pueden inducir la adopción de conformaciones que no necesariamente corresponden al conformero de mínima energía.

Además, el cálculo del momento dipolar y la polarizabilidad no sólo se realizó en vacío, sino también en solventes, como agua, metanol y ácido acético, con fines comparativos. Las variaciones en estas propiedades en solución brindan información sobre la influencia del entorno en la estabilidad electrónica y la reactividad molecular, mejorando la precisión de las predicciones sobre la interacción de las antocianidinas con otros compuestos en condiciones biológicas. En el contexto de las antocianidinas, este enfoque integral facilita la correlación entre su estructura y su actividad biológica, proporcionando una visión más detallada de las posibles interacciones moleculares en medios complejos como el celular.

6.3.1. *Momento dipolar aparente*

Se calcularon los valores del momento dipolar aparente total (μ^*) y la contribución de cada eje (x, y, z) para los conformeros de las seis antocianidinas en vacío y solventes (ácido acético, metanol y agua). En el **Anexo B (Tabla B7)** se muestran, a modo de ejemplo, los

valores obtenidos en agua debido a su similitud con entornos fisiológicos. Para evitar sesgos, se utilizó un promedio estadístico de Maxwell-Boltzmann para cada componente cartesiano μ_i^* (Bentz *et al.*, 2016), en lugar de considerar únicamente el valor de μ^* del conformero más estable. El momento dipolar aparente total resultó del promedio de las contribuciones de cada componente cartesiano.

Los resultados de este análisis se presentan en la **Tabla 6.1**. En los conformeros **Z** (no planos), los componentes del eje z tienen signos opuestos y, por lo tanto, no contribuyen significativamente en el promedio.

Tabla 6.1. Valores del momento dipolar aparente (μ^*) para pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina, calculados para todo el espacio conformacional y para el conformero más estable en vacío, ácido acético, metanol y agua. Se incluye el porcentaje de variación (V%) entre el momento dipolar aparente en todo el espacio conformacional y el del conformero más estable, tanto en vacío como en los tres solventes.

<i>Momento dipolar aparente en todo el espacio conformacional</i>						
	$\langle \mu^*_x \rangle$	$\langle \mu^*_y \rangle$	$\langle \mu^*_z \rangle$	$\langle \mu^*_{total} \rangle$	$\langle \mu^*_{total} \rangle$ [a]	V%
VACÍO						
<i>Pelargonidina</i>	-2,26	1,02	0,00	2,48	2,07	-16,76
<i>Cianidina</i>	-3,28	1,55	0,00	3,63	3,91	7,74
<i>Delfinidina</i>	-4,00	2,22	0,00	4,58	4,47	-2,37
<i>Peonidina</i>	-4,25	1,17	0,00	4,41	4,03	-8,54
<i>Petunidina</i>	-4,03	1,94	0,00	4,47	4,51	0,82
<i>Malvidina</i>	-5,99	1,98	0,00	6,31	5,39	-14,52
ÁCIDO ACÉTICO						
<i>Pelargonidina</i>	-3,89	1,67	-0,07	4,23	3,391	-19,82
<i>Cianidina</i>	-5,47	2,01	-0,04	5,83	5,94	1,90
<i>Delfinidina</i>	-6,23	2,01	-0,03	6,55	6,39	-2,40
<i>Peonidina</i>	-6,47	1,37	-0,32	6,62	6,05	-8,56
<i>Petunidina</i>	-6,26	1,97	-0,08	6,57	6,49	-1,15
<i>Malvidina</i>	-9,04	2,99	0,01	9,52	8,27	-13,09
METANOL						
<i>Pelargonidina</i>	-4,34	1,81	-0,03	4,70	3,77	-19,86
<i>Cianidina</i>	-6,14	1,71	-0,07	6,37	6,43	0,99
<i>Delfinidina</i>	-6,89	1,91	0,09	7,15	6,92	-3,23
<i>Peonidina</i>	-7,17	0,79	0,10	7,21	6,64	-7,90
<i>Petunidina</i>	-7,10	1,45	0,03	7,25	7,49	3,39
<i>Malvidina</i>	-9,92	3,03	0,00	10,37	9,15	-11,82
AGUA						
<i>Pelargonidina</i>	-4,42	1,73	-0,05	4,75	3,82	-19,54
<i>Cianidina</i>	-6,31	1,77	-0,01	6,56	6,52	-0,49
<i>Delfinidina</i>	-6,98	1,94	-0,10	7,25	7,00	-3,46
<i>Peonidina</i>	-7,31	0,82	-0,17	7,36	6,74	-8,45
<i>Petunidina</i>	-7,19	1,38	0,03	7,32	7,58	3,56
<i>Malvidina</i>	-10,03	3,08	0,00	10,50	9,28	-11,53

[a] Momento dipolar aparente total para el conformero más estable en cada solvente para cada antocianidina.

En vacío, el valor de μ^* para el confórmero más estable de pelargonidina (**Pg P CT d**) fue de 2,07 D, lo que representa una subestimación del $\sim 17\%$ en comparación con el valor de μ^* calculado para todo el espacio conformacional (2,48 D). Para cianidina, el confórmero más estable (**Cn P CT tc B**) presentó un μ^* de 3,91 D, mientras que el valor para todo el espacio conformacional fue de 3,63 D, mostrando una sobreestimación del $\sim 8\%$ al considerar únicamente el confórmero más estable. En el caso de delfinidina, el confórmero más estable (**Df P CT ctt**) tuvo un μ^* de 4,47 D, mientras que el valor para el espacio conformacional completo fue de 4,58 D (subestimación del $\sim 2\%$). Para peonidina, el confórmero más estable (**Pn P CT tc B**) tuvo un μ^* de 4,03 D, mientras que el valor para todo el espacio conformacional fue de 4,41 D (subestimación del $\sim 9\%$). En petunidina, el valor de μ^* para el confórmero más estable (**Pt P CT ctt A**) fue de 4,51 D, mientras que para todo el espacio conformacional fue de 4,47 D (sobreestimación del $\sim 1\%$). Finalmente, para malvidina, el confórmero más estable (**Mv P CT ttt**) tuvo un μ^* de 5,39 D, mientras que el valor para todo el espacio conformacional fue de 6,31 D (subestimación del $\sim 15\%$ al considerar sólo el confórmero más estable y no toda la distribución de Maxwell-Boltzmann).

Al evaluar los valores de μ^* en solución, se observó un aumento conforme aumentaba la polaridad del solvente para todas las antocianidinas. Malvidina registró los valores más altos, mientras que delfinidina, peonidina y petunidina mostraron valores similares. Cianidina y pelargonidina presentaron los valores más bajos. Entre todas las antocianidinas, pelargonidina mostró el mayor porcentaje de subestimación del momento dipolar aparente al considerar únicamente el confórmero más estable, en lugar de analizar todo el espacio conformacional, con una subestimación cercana al $\sim 20\%$ en los tres solventes evaluados.

6.3.2. Polarizabilidad molecular

Se obtuvieron los valores de polarizabilidad molecular promedio ($\langle\alpha\rangle$) para cada confórmero de las seis antocianidinas estudiadas, junto con las contribuciones de cada eje (α_{xx} , α_{yy} y α_{zz}) tanto en vacío como en los tres solventes evaluados (ácido acético, metanol y agua). En el **Anexo B (Tabla B7)** se muestran, a modo de ejemplo, los valores obtenidos en agua debido a su similitud con entornos fisiológicos. Para el cálculo de $\langle\alpha\rangle$, también se consideraron las contribuciones de los confórmeros de cada antocianidina en todo el espacio conformacional, utilizando el promedio estadístico de Maxwell-Boltzmann (Bentz *et al.*, 2014a, 2016).

Al iniciar el análisis en vacío, el confórmero más estable de pelargonidina mostró un valor de polarizabilidad de 250,40 u.a., mientras que el valor para todo el espacio conformacional (20 confórmeros) fue ligeramente superior, con 250,42 u.a. (**Tabla 6.2**), lo que representó una subestimación del $\sim 0,01\%$ al utilizar sólo el confórmero más estable. El rango de variación de polarizabilidad ($\Delta\langle\alpha\rangle$) fue de 9,02 u.a., con los confórmeros **P** (planos) mostrando una mayor polarizabilidad que los **Z1** y **Z2** (no planos). En cianidina, el confórmero más estable mostró una polarizabilidad de 260,58 u.a., ligeramente superior al valor promedio para todo el espacio conformacional (259,21 u.a., 60 confórmeros) (sobreestimación del $\sim 0,53\%$). El rango $\Delta\langle\alpha\rangle$ para cianidina en vacío fue de 14,48 u.a. Para delfinidina, el confórmero más estable presentó un valor de 267,50 u.a., ligeramente inferior

al valor promedio de todo el espacio conformacional (267,25 u.a., 37 conforméromos) (subestimación del ~0,09%). El rango $\Delta\langle\alpha\rangle$ fue de 14,73 u.a.

Tabla 6.2. Valores de polarizabilidad molecular ($\langle\alpha\rangle$) para pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina, calculados para todo el espacio conformacional y para el conforméromo más estable, evaluado en vacío, ácido acético, metanol y agua. Se incluye el porcentaje de variación (V%) entre los valores de polarizabilidad en todo el espacio conformacional y los del conforméromo más estable, tanto en vacío como en los tres solventes.

	$\langle\alpha\rangle$	$\langle\alpha\rangle^{[a]}$	V%
VACÍO			
<i>Pelargonidina</i>	250,417	250,395	-0,01
<i>Cianidina</i>	259,215	260,582	0,53
<i>Delfinidina</i>	267,254	267,496	0,09
<i>Peonidina</i>	275,086	275,788	0,26
<i>Petunidina</i>	282,286	283,185	0,32
<i>Malvidina</i>	301,740	301,576	-0,05
ÁCIDO ACÉTICO			
<i>Pelargonidina</i>	332,491	332,545	0,02
<i>Cianidina</i>	345,943	344,397	-0,45
<i>Delfinidina</i>	351,441	352,573	0,32
<i>Peonidina</i>	362,778	363,233	0,13
<i>Petunidina</i>	370,842	372,633	0,48
<i>Malvidina</i>	396,190	396,460	0,07
METANOL			
<i>Pelargonidina</i>	355,210	355,440	0,06
<i>Cianidina</i>	366,670	369,274	0,71
<i>Delfinidina</i>	374,640	375,824	0,32
<i>Peonidina</i>	387,449	388,329	0,23
<i>Petunidina</i>	395,040	395,518	0,12
<i>Malvidina</i>	421,463	421,872	0,10
AGUA			
<i>Pelargonidina</i>	358,636	359,045	0,11
<i>Cianidina</i>	370,946	372,855	0,51
<i>Delfinidina</i>	378,315	379,482	0,31
<i>Peonidina</i>	391,382	392,304	0,24
<i>Petunidina</i>	398,923	399,290	0,09
<i>Malvidina</i>	425,325	425,826	0,12

^[a] Polarizabilidad total para el conforméromo más estable en cada solvente para cada antocianidina.

En peonidina, el conforméromo más estable mostró una polarizabilidad de 275,79 u.a., mientras que el valor promedio para todo el espacio conformacional (40 conforméromos) fue de 275,09 u.a. (sobrestimación del ~0,26%). El rango $\Delta\langle\alpha\rangle$ fue de 10,66 u.a., con los conforméromos **P** (planos) mostrando mayor polarizabilidad que los **Z** (no planos). Para petunidina, el conforméromo más estable tuvo un valor de 283,18 u.a., ligeramente superior al promedio del espacio conformacional (282,29 u.a., 36 conforméromos) (sobrestimación del ~0,32%). El rango $\Delta\langle\alpha\rangle$ fue de 15,20 u.a. Finalmente, el conforméromo más estable de

malvidina presentó una polarizabilidad de 301,58 u.a., ligeramente inferior al valor promedio para todo el espacio conformacional (301,74 u.a., 20 conformeros) (subestimación del ~0,05%). El rango $\Delta\langle\alpha\rangle$ fue de 7,28 u.a.

De manera similar al análisis del momento dipolar, se observó un aumento en los valores de $\langle\alpha\rangle$ con el incremento de la polaridad del solvente utilizado en la optimización de los conformeros para cada antocianidina. Malvidina mostró los valores de polarizabilidad más altos en los tres solventes, seguida por petunidina, peonidina, delphinidina, cianidina y finalmente, pelargonidina. Así, a medida que aumenta la sustitución y la cantidad de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B, los valores de $\langle\alpha\rangle$ también aumentan. Estos resultados respaldan las propiedades de las antocianidinas para disolverse en solventes polares y su capacidad de polarizar a otros compuestos.

Las variaciones en $\langle\alpha\rangle$ entre los conformeros más estables y los valores para todo el espacio conformacional en solventes no fueron significativas.

6.4. Estructuras quinoidales cargadas positivamente

Como se ha descrito en la introducción de esta Tesis (Capítulo 1), las antocianidinas exhiben una diversidad estructural que depende significativamente de su conformación y del entorno químico en el que se encuentran. Estos compuestos son responsables de la pigmentación de muchas plantas y muestran una notable variedad de colores debido a las transformaciones estructurales dependientes del pH. Dichas transformaciones abarcan desde el catión flavilio rojo, hasta la base quinoidal púrpura, el anión quinoidal azul, el hemiacetal incoloro y las especies de chalcona de color amarillo pálido (**Figura 6.2**) (Basílico & Pina, 2016; Dangles & Fenger, 2018).

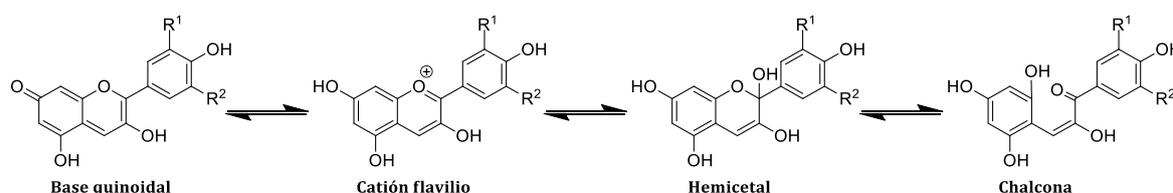


Figura 6.2. Especies en equilibrio para diferentes pH de las antocianidinas.

Generalmente, las antocianidinas se representan en su forma de sal de flavilio, que es la única especie química presente en soluciones acuosas ácidas fuertes ($\text{pH} < 3$). Sin embargo, a medida que aumenta el pH, las antocianidinas participan en dos reacciones: la *desprotonación* que da lugar a una base quinoidal, y la *hidratación*, que produce el hemiacetal. Un avance importante en la comprensión de la química del ion flavilio fue el descubrimiento de Brouillard y Dubois, quienes demostraron que, en la transición de un medio ácido a uno neutro, el hemiacetal se forma exclusivamente a través de la hidratación del catión flavilio, y no de la base quinoidal (**Figura 6.2**) (Brouillard & Dubois, 1977). Estas dos reacciones coexisten de manera competitiva, modulando el equilibrio estructural de las antocianidinas.

A lo largo del tiempo, se ha demostrado que las antocianidinas son capaces de adoptar distintas formas estructurales dependiendo de factores externos como el pH (como hemos

visto en el Capítulo 2), y estas especies reaccionan de manera diferente frente a su entorno. En condiciones de pH más elevados, las bases quinoidales y las chalconas predominan, mientras que en medios más ácidos prevalece la estructura catiónica del flavilio. El interés inicial en la química de estos compuestos fue establecido por Leonard Jurd en la década de 1960, quien destacó la importancia de estudiar los cambios estructurales de las sales de flavilio para entender mejor la química de las antocianinas (Jurd, 1963). En particular, observó que cuando el catión flavilio está sustituido en la posición 3 por un grupo metoxilo o hidroxilo, aumenta la formación de hemicetales, mientras que los compuestos flavilio sin sustituyentes en esa posición tienden a favorecer la base quinoidal. Además, se ha documentado que, en plantas, alimentos y tracto digestivo, donde el pH varía entre 2 y 8, varios procesos contribuyen a estabilizar la estructura del catión flavilio o de la base quinoidal (Brouillard, 1982; Goto & Kondo, 1991; Dangles *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 2009). Estos incluyen co-pigmentación, autoasociación intramolecular e intermolecular, formación de pares iónicos, y complejación con otros polifenoles o metales (Asen *et al.*, 1972; Kondo *et al.*, 1992; Maeshima, 2001) (como hemos visto en el Capítulo 2), los cuales son fundamentales para el transporte de antocianinas a través de medios biológicos y su llegada a sitios activos (Boulton, 2001). De esta manera, se pueden encontrar antocianidinas y antocianinas en su forma de catión flavilio o base quinoidal, a pH fuera de su rango de estabilidad normal, evitando su degradación a formas hemicetálicas o del tipo chalcona (menos reactivas).

En este contexto, el análisis geométrico profundo de las antocianidinas, tanto en su forma hidroxilada como metoxilada, en todo su espacio conformacional, resulta clave para identificar patrones estructurales que puedan arrojar luz sobre la estabilidad de los confórmeros en diferentes condiciones. Además, al estudiar cómo cambian las distancias de enlace en estos confórmeros, se puede observar cómo las antocianidinas pueden desviarse de su comportamiento típico de sales de flavilio.

Este enfoque geométrico, centrado en las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros, es de relevancia tanto para las antocianidinas hidroxiladas como para las metoxiladas. En las antocianidinas hidroxiladas, los grupos OH del anillo B ejercen una influencia notable sobre la geometría molecular, mientras que, en las metoxiladas, los voluminosos grupos OCH₃ añaden complejidad, afectando las distancias y los ángulos de enlace debido a efectos de conjugación y tensiones estéricas adicionales. Estas variaciones geométricas proporcionan pistas sobre la formación de estructuras quinoidales y su estabilidad relativa en diferentes medios, lo que es fundamental para comprender cómo las antocianidinas interactúan en sistemas biológicos.

Además, a pesar de la estabilización que ofrecen procesos como la autoasociación, nuestro interés principal en este Capítulo está dirigido a la caracterización de las especies reactivas de las antocianidinas, las cuales se encuentran en estado monomérico. Estas especies monoméricas son relevantes por su reactividad química y su función en diversos procesos biológicos. Comprender su estructura geométrica es esencial para avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes de estabilización de las antocianidinas y su aplicación directa en sistemas biológicos de interés.

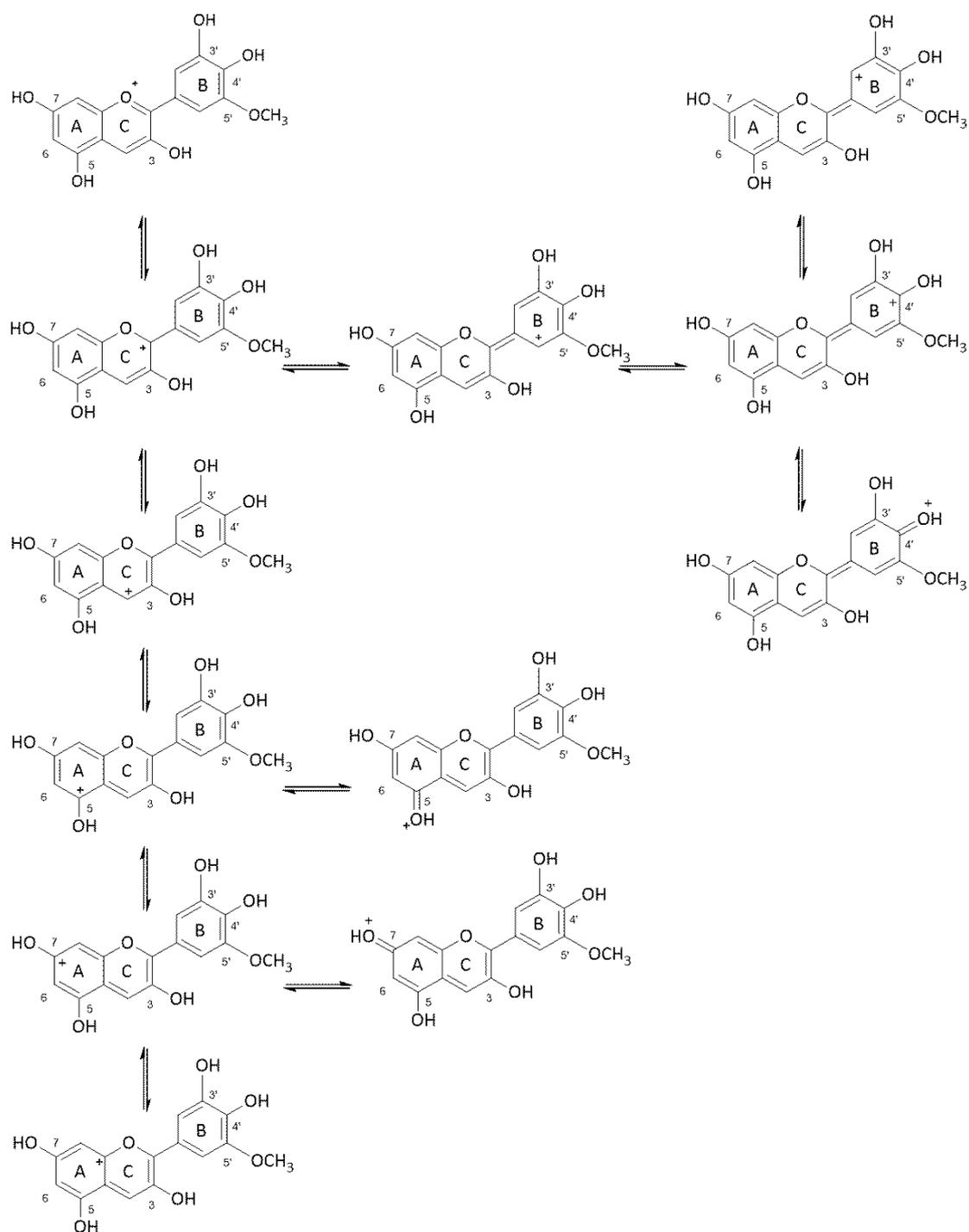


Figura 6.3. Estructuras resonantes de las antocianidinas, siendo R_1 y $R_2 = H, OH$ o OCH_3 .

Las antocianidinas, presentan diversas conformaciones que se encuentran en un equilibrio resonante con diferente distribución de carga positiva en la molécula. Estas estructuras resonantes, que coexisten de manera dinámica, permiten la deslocalización de la carga positiva en toda la molécula (**Figura 6.3**), afectando no sólo a la estabilidad de las antocianidinas, sino también a su reactividad y a sus propiedades fisicoquímicas en diferentes entornos.

En resumen, el análisis geométrico detallado de las antocianidinas en todo su espacio conformacional, a través de la evaluación de distancias de enlace, ángulos y ángulos diedros,

condujo a identificar conformaciones que difieren de la representación clásica de las sales de flavilio, mostrando comportamientos más cercanos a **estructuras quinoidales**.

6.4.1. *Distancias de enlace en antocianidinas hidroxiladas*

En las antocianidinas el heteroátomo modifica las propiedades electrónicas del anillo C en comparación con los anillos A y B, especialmente debido a la marcada diferencia de electronegatividad entre el O1 y los átomos de carbono circundantes. Esto produce longitudes de enlace distintivas en el anillo C, así como una mayor dispersión en los valores de enlace, en comparación con los otros dos anillos. Las longitudes de enlace C-C de los anillos A, B y C para pelargonidina, cianidina y delfinidina se muestran en la **Figura 6.4 (a-c)**, mientras que las longitudes de enlace O-H se presentan en la **Figura 6.4 (d)**, y las longitudes C-OH en la **Figura 6.4 (e)**. Como referencia, se utilizó la longitud de enlace C-C del benceno (aproximadamente 1,394 Å).

Se sabe que las antocianidinas pueden formar estructuras quinoidales neutras, radicalarias/diradicalarias o incluso aniónicas. Sin embargo, en esta Tesis se identificaron también **estructuras quinoidales con carga positiva (Figura 6.5 (a y b))**, que no habían sido descritas previamente, evidenciadas a partir del análisis del espacio conformacional de estas moléculas. Al observar las longitudes de enlace O-H (**Figura 6.4 (d)**), se encontró que éstas eran similares para todas las posiciones de las tres antocianidinas, excepto HO-4' para cianidina y delfinidina, donde aumentaron ligeramente ($\sim 0,002\text{Å}$ y $\sim 0,004\text{Å}$ respectivamente). En cambio, la longitud del enlace HO-4' en pelargonidina no mostró variaciones significativas respecto a otros enlaces O-H. Se observó que la longitud de enlace en HO-4' aumentó con la mayor sustitución del anillo B, sugiriendo un comportamiento estructural distinto según el grado de sustitución; los grupos HO-3' y HO-5' no presentaron esta tendencia.

También se observaron diferencias importantes en la longitud de los enlaces C-OH (**Figura 6.4 (e)**), siendo C4'-OH y C7-OH los más cortos para los tres compuestos, lo cual, junto con el comportamiento de HO-4', respalda la hipótesis de la formación de estructuras quinoidales con carga positiva (**Figura 6.4 (a y b)**). Al dividir el espacio conformacional en confórmeros **P** (planos) y **Z** (no planos), los confórmeros **Z** mostraron una menor longitud de enlace C7-OH ($\sim 1,341\text{Å}$) que los **P** ($\sim 1,343\text{Å}$), mientras que el enlace C4'-OH presentó un comportamiento opuesto, siendo más corto en los confórmeros **P** ($\sim 1,339\text{Å}$) que en los **Z** ($\sim 1,342\text{Å}$) para los tres compuestos. Estos resultados sugieren que los confórmeros **P** están más asociados con la **primera estructura quinoidal con carga positiva (Figura 6.5 (a))**, mientras que los confórmeros **Z** con la **segunda (Figura 6.5 (b))**.

La variación de las longitudes de enlace C-C en los anillos A, B y C también respaldó la existencia de estructuras quinoidales con carga positiva. En el anillo A (**Figura 6.4 (a)**), los enlaces C5-C6 y C8-C9 fueron los más cortos (promediando $\sim 1,378\text{Å}$ y $\sim 1,384\text{Å}$ para los confórmeros **P** (planos) y $\sim 1,377\text{Å}$ y $\sim 1,382\text{Å}$ para los **Z**), todos con valores menores a los típicos de un enlace aromático C-C ($\sim 1,394\text{Å}$ en benceno), indicativos de la segunda estructura quinoidal con carga positiva (**Figura 6.5 (b)**); los confórmeros **Z** (no planos) están más alineados con esta estructura. Por otro lado, en el anillo B (**Figura 6.4 (b)**), los enlaces C2'-C3' y C5'-C6' mostraron valores más bajos (promediando $\sim 1,377\text{Å}$ y $\sim 1,381\text{Å}$)

en los conforméromos **P** que en los **Z** (promediando $\sim 1,382\text{\AA}$ y $\sim 1,385\text{\AA}$), nuevamente respaldando que los conforméromos **P** están más relacionados con la **primera estructura quinoidal con carga positiva (Figura 6.5 (a))**.

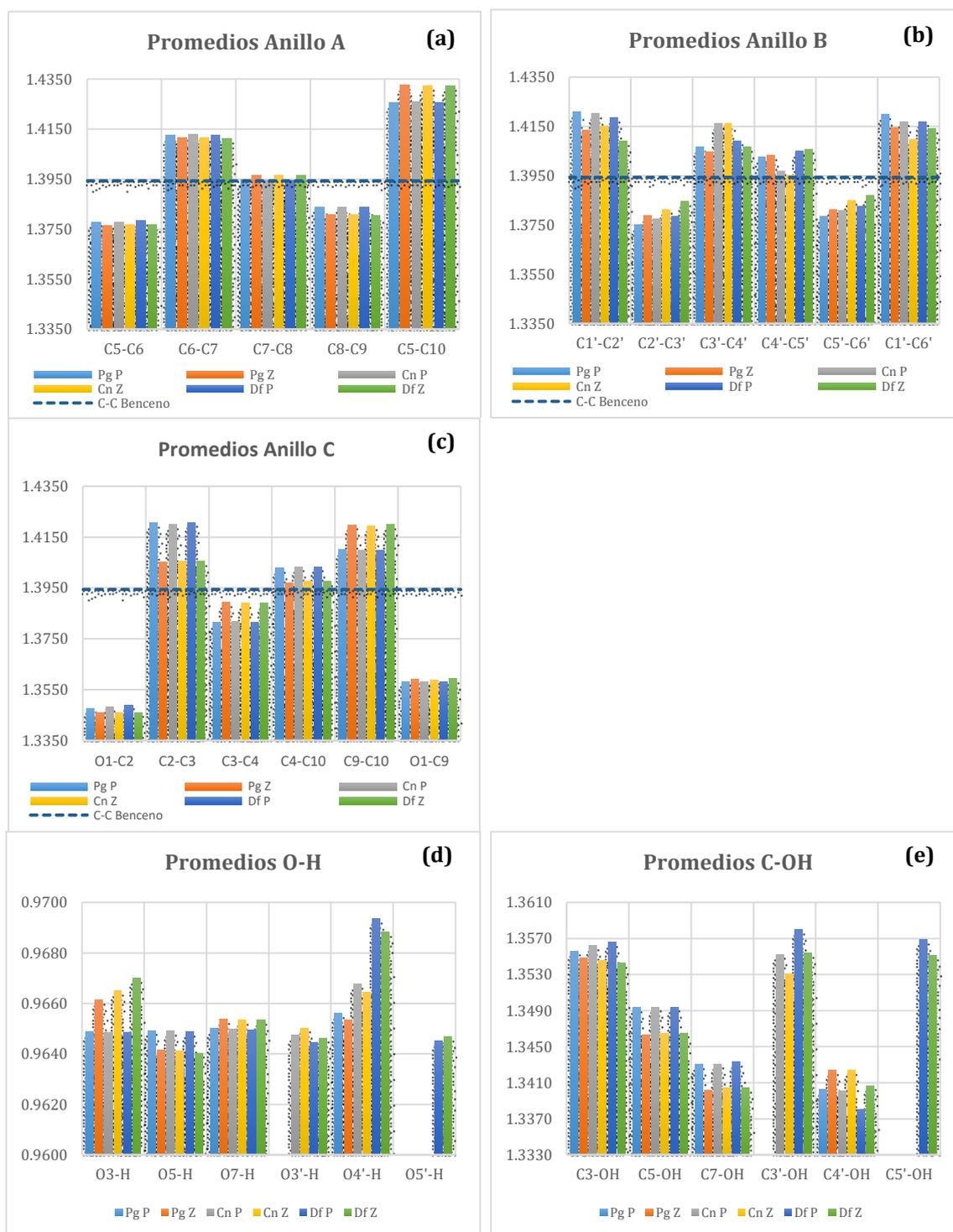


Figura 6.4. Promedios de las longitudes de enlace C-C en el anillo A (a), C-C en el anillo B (b), C-C en el anillo C (c), O-H (d) y C-OH (e) para los conforméromos **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina y delphinidina. Se utilizó como referencia la longitud de enlace C-C del benceno ($\sim 1,394\text{\AA}$), calculada en el nivel teórico B3LYP/6-311G++(d,p).

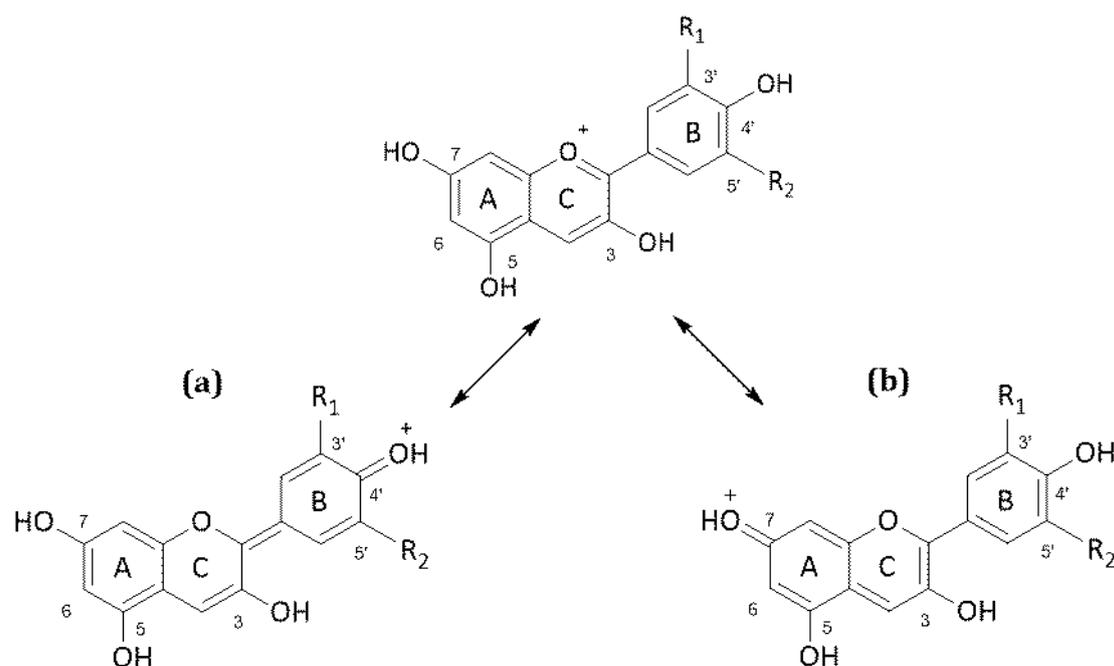


Figura 6.5. Principales estructuras quinoidales cargadas positivamente, siendo R_1 y $R_2 = H, OH$ o OCH_3 .

Finalmente, en el anillo C (**Figura 6.4 (c)**), el enlace C3-C4 fue el más corto, mostrando que los conformeros **P** ($\sim 1,382\text{\AA}$) están más cercanos a la primera estructura quinoidal, que contiene un doble enlace C3-C4 (**Figura 6.5 (a)**). En contraste, la segunda estructura quinoidal (**Figura 6.5 (b)**), con dobles enlaces en C2-C3 y C4-C10, se asocia más con los conformeros **Z**, que mostraron longitudes de enlace más cortas en estas posiciones ($\sim 1,406\text{\AA}$ y $\sim 1,397\text{\AA}$) que los **P** ($\sim 1,420\text{\AA}$ y $\sim 1,403\text{\AA}$).

En resumen, tanto los conformeros **P** como **Z** exhiben estructuras quinoidales con carga positiva, coexistiendo simultáneamente con otras estructuras resonantes. Sin embargo, la primera estructura quinoidal (**Figura 6.5 (a)**) posee una mayor abundancia estadística, por estar más asociada con los conformeros **P**.

6.4.2. *Distancias de enlace en antocianidinas metoxiladas*

Las antocianidinas metoxiladas, como peonidina, petunidina y malvidina, presentan comportamientos similares, pero con ciertas variaciones interesantes debido a la sustitución con grupos metoxilo. A través de este análisis detallado, se observó que las antocianidinas metoxiladas también presentan estructuras quinoidales con carga positiva, similar a lo observado en las hidroxiladas.

Las longitudes promedio de enlace C-C en los anillos A, B y C para las tres antocianidinas metoxiladas se muestran en la **Figura 6.6 (a-c)** y las longitudes de enlace O-H y C-OH en la **Figura 6.6 (d y e)**. Como referencia, se tomó nuevamente la longitud del enlace C-C del benceno ($\sim 1,394\text{\AA}$). Las longitudes promedio de enlace en los conformeros **P** (planos) y **Z** (no planos) de peonidina, petunidina y malvidina fueron calculadas al mismo nivel teórico (B3LYP/6-311G++(d,p)). A partir del análisis de las distancias de enlace, se

identificaron patrones que respaldan la formación de estructuras quinoidales cargadas positivamente.

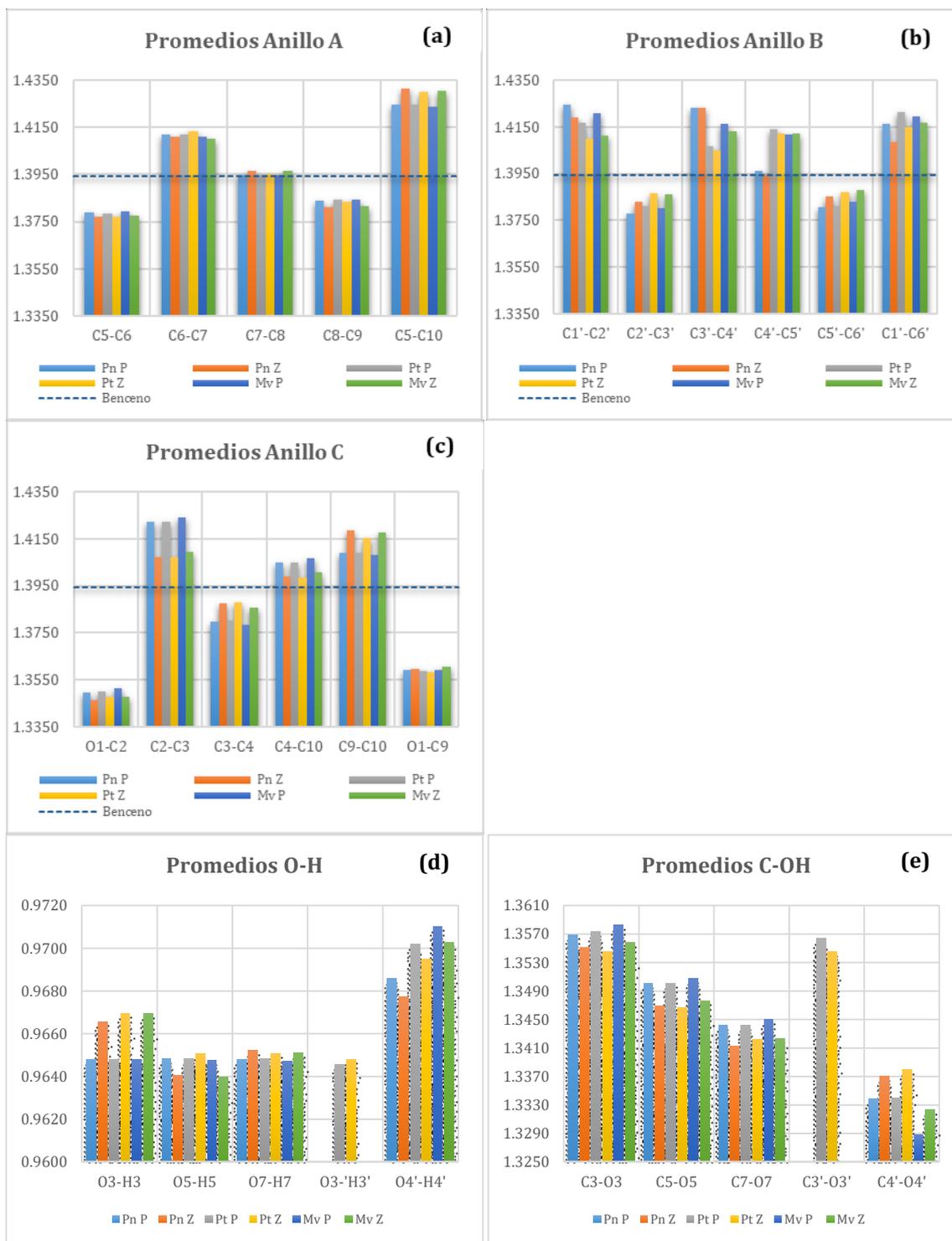


Figura 6.6. Promedios de las longitudes de enlace C-C en el anillo A (a), C-C en el anillo B (b), C-C en el anillo C (c), O-H (d) y C-OH (e) para los conformeros **P** y **Z** de peonidina, petunidina y malvidina. Se utilizó como referencia la longitud de enlace C-C del benceno ($\sim 1,394$ Å), calculada en el nivel teórico B3LYP/6-311G++(d,p).

En el anillo A, los enlaces C5-C6 y C8-C9 fueron los más cortos, con valores promediando $\sim 1,379$ Å y $\sim 1,384$ Å para los conformeros **P** y $\sim 1,377$ Å y $\sim 1,382$ Å para los **Z**,

indicando una mayor afinidad de los confórmeros **Z** (no planos) hacia la segunda estructura quinoidal cargada positivamente (**Figura 6.5 (b)**), al igual que en las antocianidinas hidroxiladas. En el anillo B, los enlaces C2'-C3' y C5'-C6' también fueron más cortos en los **P** ($\sim 1,380\text{\AA}$ y $\sim 1,382\text{\AA}$) que en los **Z** ($\sim 1,385\text{\AA}$ y $\sim 1,387\text{\AA}$), lo que sugiere que los confórmeros **P** (planos) están más relacionados con la primera estructura quinoidal cargada positivamente (**Figura 6.5 (a)**).

El anillo C mostró un comportamiento similar, siendo el enlace C3-C4 el más corto. Los confórmeros **P** presentaron longitudes de enlace más reducidas ($\sim 1,379\text{\AA}$) que los **Z** ($\sim 1,387\text{\AA}$), lo que asocia a los confórmeros **P** con la primera estructura quinoidal con carga positiva, la cual contiene un doble enlace C3-C4 (**Figura 6.5 (a)**). En cambio, la segunda estructura quinoidal cargada positivamente mostró dobles enlaces en C2-C3 y C4-C10, siendo más cortos en los confórmeros **Z** ($\sim 1,408\text{\AA}$ y $\sim 1,399\text{\AA}$) que en los **P** ($\sim 1,423\text{\AA}$ y $\sim 1,405\text{\AA}$).

Además, las antocianidinas metoxiladas mostraron longitudes de enlace O-H similares en las diferentes posiciones, excepto en HO-4', donde se observó un aumento a medida que se incrementaba la sustitución en el anillo B. Este comportamiento, combinado con lo observado en los enlaces C-OH, respaldó la existencia de estructuras quinoidales cargadas positivamente, particularmente en los confórmeros **Z**, del tipo de la segunda estructura quinoidal (**Figura 6.5 (b)**). Los confórmeros **P**, en cambio, se asociaron más con la primera estructura quinoidal (**Figura 6.5 (a)**), siendo ésta la más representada estadísticamente en el espacio conformacional de estas antocianidinas.

6.4.3. *Otros aspectos geométricos*

Las longitudes de enlace C-H de mayor interés para el análisis son C6'-H en pelargonidina, delphinidina y malvidina, así como C2'-H y C6'-H en cianidina, peonidina y petunidina. Sus valores fueron los más bajos, lo que sugiere una mayor estabilidad de estos enlaces. En pelargonidina, delphinidina y malvidina, el H-6' se encuentra próximo al grupo HO-3 del anillo C. En cianidina, peonidina y petunidina, los confórmeros **A** también presentan esta disposición, aunque en los confórmeros **B** el H-2' asume una posición equivalente. Esto sugiere la posible formación de un puente de hidrógeno entre H-2' y/o H-6' y el oxígeno del HO-3, favoreciendo la formación de un anillo de seis miembros (**Figura 5.30**) (Pereira *et al.*, 1996, 1997).

Los ángulos de enlace brindan información valiosa sobre el grado de aromaticidad de los tres anillos. Los anillos aromáticos suelen mostrar ángulos de enlace cercanos a 120° debido a la hibridación sp^2 , pero ninguno de los tres anillos de las antocianidinas analizadas presentó ángulos exactos de 120° . Las desviaciones promedio fueron de hasta $5,5^\circ$ para el anillo C, $3,6^\circ$ para el anillo A y $2,3^\circ$ para el anillo B.

En el anillo B, cianidina, que tiene dos grupos hidroxilo en posiciones vecinas (HO-3' y HO-4'), mostró interacciones que afectaron la geometría de este anillo. En las conformaciones planas, las disposiciones **tt** en el anillo B revelaron ángulos similares para C3'-OH y C4'-OH ($\sim 110,0^\circ$ y $\sim 111,3^\circ$ respectivamente). Sin embargo, cuando los sustituyentes estaban en una disposición coordinada, como en los confórmeros **ct** y **tc**, el

ángulo C4'-OH en los conformeros **ct** fue significativamente mayor ($\sim 112,4^\circ$) que HO-3' ($\sim 110,0^\circ$), mientras que en los conformeros **tc**, el ángulo C4'-OH fue menor ($\sim 110,0^\circ$) que HO-3' ($\sim 112,4^\circ$), lo cual puede deberse a interacciones intramoleculares de tipo puente de hidrógeno, como C4'-O---H-O-C3' en los conformeros **ct** y C3'-O---H-O-C4' en los **tc** (**Figura 5.30**).

Este comportamiento también se observó en los conformeros de delfinidina, que se dividen en dos grupos según la orientación de los tres sustituyentes en el anillo B. El primer grupo comprende los conformeros con sustituyentes en una orientación coordinada (**CC ctt**, **CC tcc**, **CT ctt** y **CT tcc**). Las disposiciones **ctt** mostraron una coordinación en sentido horario, con ángulos C3'-O-H y C4'-O-H considerablemente menores ($\sim 110,1^\circ$ y $\sim 110,4^\circ$ respectivamente) que el ángulo C5'-O-H ($\sim 112,3^\circ$). Como se observó en cianidina, la disminución de estos ángulos puede explicarse por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, como C3'-O---H-O-C4' y C4'-O---H-O-C5' (**Figura 5.30**). El segundo grupo corresponde a los conformeros **tcc**, con una coordinación en sentido antihorario, donde los ángulos C4'-O-H y C5'-O-H fueron menores ($\sim 110,4^\circ$ y $\sim 110,1^\circ$ respectivamente) que el ángulo C3'-O-H ($\sim 112,2^\circ$), debido a los puentes de hidrógeno C4'-O---H-O-C3' y C5'-O---H-O-C4'.

Para las antocianidinas metoxiladas, este análisis geométrico presenta limitaciones significativas debido al tamaño voluminoso de los grupos metoxilo. A diferencia de las antocianidinas hidroxiladas, donde es posible llevar a cabo un análisis de los ángulos de enlace y de las posibles interacciones intramoleculares, la presencia de grupos metoxilo en el anillo B limita este análisis por las distorsiones geométricas debidas a efectos de conjugación y tensiones estéricas adicionales que desestabilizan el equilibrio conformacional observado en las antocianidinas con grupos hidroxilo.

En resumen, las limitaciones impuestas por los grupos metoxilo voluminosos modifican las interacciones y la geometría local de las antocianidinas metoxiladas, imposibilitando la comparación directa con los resultados obtenidos para las estructuras hidroxiladas. Esta situación requiere un enfoque diferenciado para estudiar las propiedades geométricas de las antocianidinas metoxiladas y sus interacciones.

En cuanto a los ángulos diedros, los conformeros más estables (**P**) mostraron una coplanaridad casi perfecta de los tres anillos A-C-B y sus sustituyentes OH, con ángulos cercanos a 0° o 180° . Sin embargo, cuando el anillo B se desalinea del plano (conformeros **Z1** y **Z2**), los ángulos diedros en los anillos A, B y C presentan desviaciones, causando estructuras torsionadas, como por ejemplo en pelargonidina (**Figura 6.7**). Los conformeros **Z1** y **Z2** mostraron torsiones opuestas de igual magnitud en valor absoluto. El anillo C fue el más deformado, seguido del anillo B, y finalmente, el anillo A.

Esta pérdida de planaridad dio lugar a nuevos conformeros **Z** (no planos), denominados **Z***, que no tienen equivalentes planos. Ejemplos de estos conformeros incluyen **Pg Z1 TC d**, **Pg Z2 TC d**, **Pg Z1 TC u**, **Pg Z2 TC u**, **Pg Z1 TT d**, **Pg Z2 TT d**, **Pg Z1 TT u** y **Pg Z2 TT u** en pelargonidina. Como era de esperar, estos conformeros **Z*** mostraron torsiones más pronunciadas que los **P**. Este mismo comportamiento también se observó en el resto de las antocianidinas, lo que sugiere que la pérdida de planaridad y la aparición de conformeros **Z*** son características comunes en esta familia de compuestos.

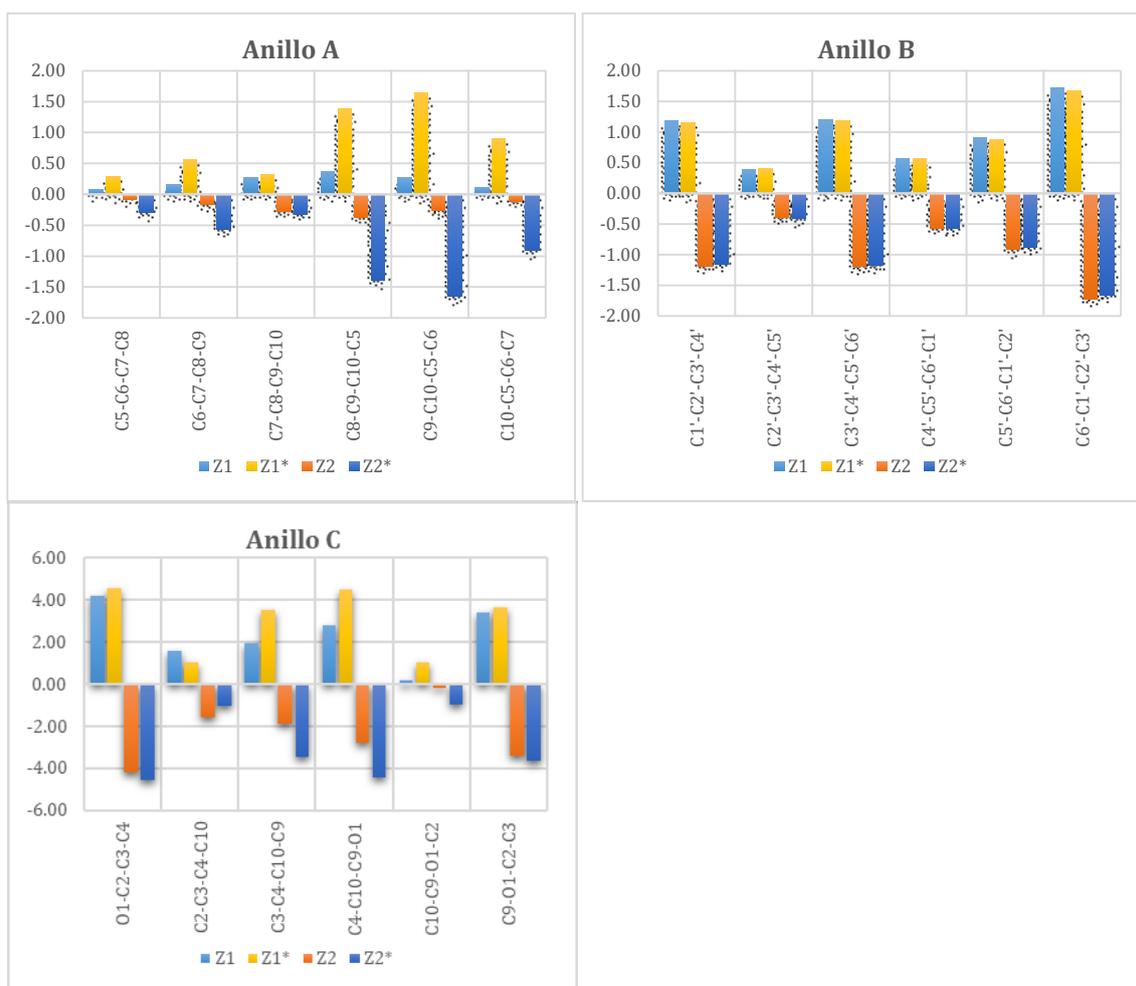


Figura 6.7. Variaciones más significativas, tanto positivas como negativas, de los ángulos diedros en los confórmeros **Z** y **Z*** de los anillos A, B y C, en comparación con los confórmeros **P** de pelargonidina.

6.5. Estudio electrónico y topológico

El análisis de la estructura electrónica y topológica de las antocianidinas permite comprender las propiedades moleculares que definen su estabilidad y su relación con el espacio conformacional. A través de un enfoque que combina diversas herramientas computacionales y conceptos avanzados de Química Teórica, se busca dilucidar de manera integral cómo las cargas naturales atómicas, las poblaciones de los orbitales π y la topología de la densidad de carga electrónica influyen en la estabilidad conformacional y el comportamiento de las antocianidinas.

La evaluación de las cargas naturales atómicas (estudio NBO) permite interpretar la deslocalización electrónica y las interacciones intramoleculares que estabilizan o desestabilizan las conformaciones de las antocianidinas (Ali *et al.*, 2016). Este tipo de análisis es relevante para describir los efectos estereoelectrónicos en las antocianidinas metoxiladas e hidroxiladas, ya que el tamaño y la naturaleza de los sustituyentes afectan considerablemente la distribución de carga en cada región de la molécula.

Otro aspecto central que se aborda a continuación es el análisis de la ocupación de los orbitales π , que da una medida de las poblaciones electrónicas en cada compuesto. Las antocianidinas, al tener sistemas π conjugados, presentan una dinámica deslocalización electrónica dentro de sus anillos aromáticos, cuya extensión impacta directamente en las propiedades ópticas y la estabilidad estructural. Al explorar este sistema de orbitales π , se busca correlacionarlo con los patrones de estabilización conformacional, considerando cómo el entorno molecular (como el solvente o las interacciones intermoleculares) afecta estas propiedades.

Finalmente, el análisis de los BCPs a través de la teoría AIM es una herramienta rigurosa para estudiar las interacciones dentro de la molécula. En este marco, el parámetro de elipticidad (ϵ) permite evaluar la naturaleza de los enlaces químicos. La elipticidad refleja el grado de distorsión o concentración de la densidad electrónica en un enlace, ayudando a determinar si presenta características de tipo doble o simple, o bien, si está sujeto a otros efectos electrónicos más complejos. Este análisis topológico es esencial para comprender las variaciones en la densidad electrónica y las fuerzas intramoleculares que dominan el comportamiento de las antocianidinas en su espacio conformacional.

Al integrar estos estudios electrónicos y topológicos, se pretende ofrecer una caracterización detallada de las antocianidinas que contribuya no sólo al entendimiento de sus propiedades moleculares, sino también a su aplicación en contextos biológicos y farmacéuticos.

Para llevar a cabo este análisis detallado y comparativo, se seleccionaron tres antocianidinas hidroxiladas (pelargonidina, cianidina y delphinidina) y una antocianidina metoxilada (peonidina). Esta selección permite comparar los efectos de los grupos hidroxilo frente a los grupos metoxilo en la distribución electrónica, la estabilidad conformacional y las propiedades electrónicas. Se buscó además visualizar cómo la sustitución en el anillo B afecta a las propiedades moleculares.

Esta estrategia simplifica el análisis comparativo, centrándose en el subconjunto representativo de las seis antocianidinas estudiadas. Además, abre la posibilidad de expandir este análisis y establecer un marco robusto sobre el cual continuar las investigaciones.

6.5.1. *Cargas naturales atómicas (NBOs)*

El cálculo de la carga atómica en una molécula o complejo es fundamental, ya que estas cargas afectan propiedades físicas como la polarizabilidad molecular, el momento dipolar y la estructura electrónica, entre otras características moleculares (Sidor *et al.*, 2010; Gangadharana *et al.*, 2014). Si bien el análisis de carga de Mulliken ha sido muy utilizado, presenta limitaciones en términos de estabilidad numérica y fiabilidad. Por ello, el análisis de cargas naturales NBO se propone como una alternativa más precisa para comprender la distribución electrónica en una molécula. Este enfoque también permite identificar pares donador-aceptor y la transferencia de carga dentro de la molécula, siendo útil para explicar fenómenos como la modificación de la electronegatividad y los procesos de transferencia de carga, como en la formación de puentes de hidrógeno (Maksić, 1991; Ermiş *et al.*, 2020).

Las antocianidinas, en su representación clásica como sales de flavilio, exhiben un oxígeno en un anillo aromático con carga positiva localizada, y se propone que la deslocalización de esta carga positiva en la molécula está facilitada por la extensa conjugación de los orbitales π . A través del análisis NBO, se puede calcular la carga natural atómica de cada átomo y analizar cómo se distribuye esta carga en toda la estructura. Así, se pueden identificar áreas de mayor y menor carga natural dentro de la molécula. En la **Figura 6.8**, se muestran los promedios de las cargas naturales para cada átomo, evaluando el espacio conformacional completo de las cuatro antocianidinas estudiadas. De este análisis, se identifican átomos con mayor carga natural positiva y otros con mayor carga natural negativa.

Al analizar la posible deslocalización de la carga positiva del oxígeno del anillo C, es intuitivo considerar estructuras resonantes que contribuyan a esta deslocalización. La carga natural positiva tiende a concentrarse principalmente en los carbonos adyacentes a los átomos de oxígeno (catión pirilio, hidroxilos y/o metoxilos), que estabilizan la carga positiva mediante la donación de electrones desde los orbitales π (Ali & Ali, 2017). De acuerdo con este análisis, los átomos C-2, C-5, C-7, C-9 y C-4' presentan las cargas naturales positivas más altas, con valores entre 0,263 y 0,421 y con promedios de $\sim 0,400$, $\sim 0,392$, $\sim 0,389$, $\sim 0,382$ y $\sim 0,341$ respectivamente, al considerar todo el espacio conformacional para cada antocianidina. El C-3 también muestra carga positiva, pero de menor magnitud (0,232-0,261), con un promedio de $\sim 0,241$. En delfinidina, C-3' y C-5', debido a la presencia de grupos hidroxilo, también muestran carga positiva (0,266-0,282), con promedios de $\sim 0,278$ y $\sim 0,274$ respectivamente. En cianidina C-3', al que se une un segundo grupo hidroxilo, muestra un comportamiento similar ($\sim 0,270$). En peonidina, el grupo metoxilo en C-3' produce una carga positiva con valores promedio de $\sim 0,269$. En pelargonidina, donde no hay grupos adicionales hidroxilo o metoxilo en el anillo B, C-3' y C-4' exhiben cargas naturales negativas.

Los C-6 y C-8 exhiben carga negativa (-0,332 a -0,315), con promedios de $\sim 0,331$ y $\sim 0,320$ respectivamente, al evaluar todo el espacio conformacional. También se observan cargas negativas en C-1', C-2' y C-6', cuya magnitud depende del patrón de sustitución en el anillo B, así como en C-10, que presenta valores de carga natural negativa en el rango de -0,174 a -0,160, con un promedio de $\sim 0,167$.

Los grupos aceptores de electrones en posiciones *orto* y *para* disminuyen la longitud del enlace C-O en estructuras tipo fenol, basándose en los argumentos clásicos de resonancia. Este comportamiento sugiere que dichos grupos favorecen la formación de estructuras de resonancia quinoidales, debido a su capacidad para deslocalizar los pares libres del átomo de oxígeno. Por otro lado, los grupos donores de electrones generan efectos contrarios, predominando las estructuras de tipo 'anillo aromático' (Gross & Seybold, 2001). Este efecto se observa en la menor carga negativa de O-4' en cianidina y delfinidina, en comparación con pelargonidina y peonidina (**Figura 6.8**).

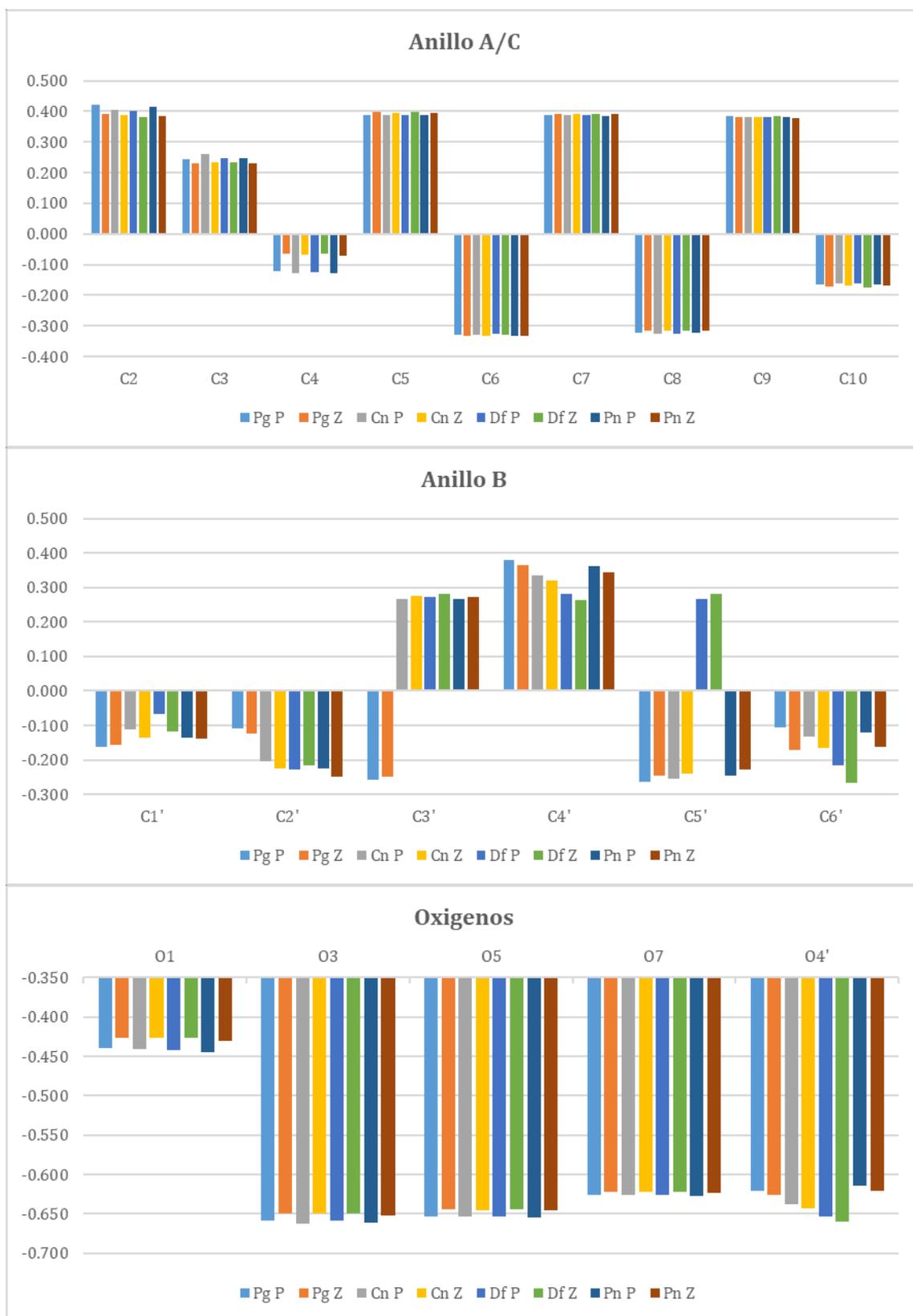


Figura 6.8. Promedio de las cargas naturales para cada átomo evaluando todo el espacio conformacional en los conformeros P y Z de pelargonidina, cianidina, delphinidina y peonidina.

Un análisis más detallado de los confórmeros **P** y **Z** para cada antocianidina revela diferencias en la distribución de carga natural, permitiendo relacionar este comportamiento con las estructuras resonantes que se discuten a lo largo de este Capítulo (**Figura 6.3**).

Tabla 6.3. Suma de las cargas naturales para los anillos A/C y el anillo B en los confórmeros **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina, delphinidina y peonidina.

	Anillo A/C		Anillo B	
	P	Z	P	Z
Pg	0,711	0,791	0,289	0,209
Cn	0,698	0,787	0,302	0,213
Df	0,687	0,787	0,313	0,213
Pn	0,676	0,759	0,324	0,241

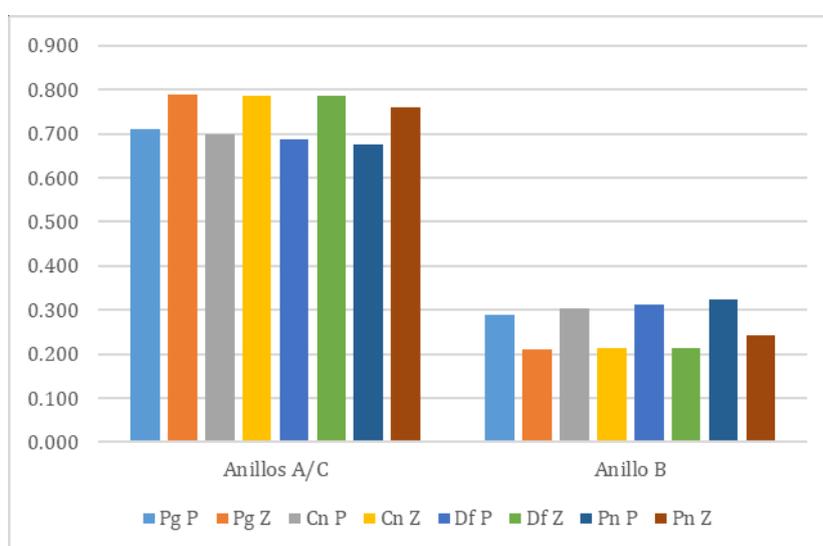


Figura 6.9. Suma de las cargas naturales para el conjunto de anillos A/C, y el anillo B, para los confórmeros **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina, delphinidina, y peonidina.

Por ejemplo, las cargas en C-5 y C-7 son más positivas en los confórmeros **Z** (~0,396 y ~0,392) que en los **P** (~0,388 y ~0,388). Para C-4, los confórmeros **Z** (no planos) muestran una carga negativa menor (~0,068) que los **P** (planos) (~0,125), lo cual sugiere una mayor deslocalización de carga positiva en los confórmeros **Z** en los átomos de los anillos A/C. Por otro lado, en C-4', C-2' y C-6', los confórmeros **P** exhiben mayor carga positiva o menos negativa (~0,339, ~0,192 y ~0,144 respectivamente) que los **Z** (~0,323, ~0,204 y ~0,191 respectivamente), indicando una mayor deslocalización de carga en el anillo B de los confórmeros **P** que en los **Z**.

Este comportamiento concuerda con la propuesta, previamente presentada, de estructuras quinoidales cargadas positivamente en el espacio conformacional de las antocianidinas (**Figura 6.5**). Las cargas observadas en los oxígenos también la respaldan. Los O-7 y O-4' tienen carga natural menos negativa que O-3 y O-5. En particular, O-4' presenta una carga menos negativa en los confórmeros **P** (~0,631) que en los **Z** (~0,637), lo que podría sugerir una mayor deslocalización de carga positiva en esta región para los confórmeros **P**.

Otra forma de analizar la distribución de carga en la estructura de cada antocianidina, es sumando las cargas naturales en los anillos A/C y B (**Tabla 6.3**). Con este análisis se identifican áreas de mayor o menor concentración de carga en cada estructura. A medida que aumenta la sustitución en el anillo B, se observa que la carga se concentra en mayor medida en dicho anillo (**Figura 6.9**). Además, los confórmeros **P** (planos) muestran una mayor deslocalización de carga en toda la molécula, con cargas más positivas en el anillo B, mientras que en los **Z** (no planos), la carga se concentra en los anillos A/C.

6.5.2. *Estudio del sistema π*

El análisis del sistema electrónico π en las antocianidinas es fundamental para entender tanto su estabilidad como su reactividad química. Aunque estos compuestos comparten un esqueleto estructural común, las diferencias en el tipo de sustituyentes y sus posiciones generan una redistribución electrónica que afecta directamente la dinámica del sistema π . Esta variación en la población electrónica influye en propiedades como la deslocalización de carga, la reactividad química y la estabilidad molecular.

El sistema π se refiere a los orbitales π que participan en la deslocalización electrónica a lo largo de los anillos aromáticos. Están formados por la superposición lateral de orbitales p de los átomos que constituyen los anillos, lo que da lugar a una nube de densidad electrónica deslocalizada. En las antocianidinas, esta deslocalización del sistema π es esencial para su estabilidad, propiedades ópticas y capacidad de interactuar con otros sistemas moleculares. Sin embargo, para conocer esta deslocalización electrónica, es necesario también considerar la contribución de los pares libres de los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo (OH) y metoxilo (OCH₃), los cuales pueden interactuar con el sistema π .

El análisis NBO es muy útil para estudiar la distribución electrónica en los sistemas π , ya que permite transformar los orbitales moleculares canónicos deslocalizados en orbitales localizados que reflejan con mayor precisión los enlaces químicos y las interacciones electrónicas dentro de la molécula. Al realizar esta transformación, el análisis NBO también permite identificar las contribuciones de los pares libres de los átomos de oxígeno, como es el par libre 2n del oxígeno. El primer par libre (1n) del oxígeno, en cambio, está más orientado hacia el plano del enlace C-O, lo que lo hace menos propenso a participar en la deslocalización electrónica con el sistema π .

La inclusión del par libre 2n del oxígeno en el análisis NBO del sistema π permite capturar la totalidad de las interacciones electrónicas que afectan la estructura y propiedades de las antocianidinas. Esta interacción entre el sistema π y los pares libres de los oxígenos puede modificar la capacidad de deslocalización electrónica y, por ende, influir en la estabilidad y reactividad de las moléculas, especialmente en posiciones como el O-4' del anillo B y el O-7 del anillo A.

Para iniciar el análisis, se determinaron las ocupaciones de los orbitales, que representan la población electrónica promedio de los orbitales que integran el sistema π en los distintos anillos para las antocianidinas en estudio (**Tablas 6.4 y 6.5**).

Tabla 6.4. Ocupación de los orbitales que miden la población electrónica promedio de los pares libres de los oxígenos (2n) y los orbitales enlazantes (π_{c-c}) que forman parte del sistema π en los anillos A/C y el anillo B, para los confórmers **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina, delphinidina y peonidina.

	<i>Pg P</i>	<i>Pg Z1</i>	<i>Pg Z2</i>	<i>Cn P</i>	<i>Cn Z1</i>	<i>Cn Z2</i>	<i>Df P</i>	<i>Df Z1</i>	<i>Df Z2</i>	<i>Pn P</i>	<i>Pn Z1</i>	<i>Pn Z2</i>
BD 2												
Anillos A/C												
<i>2n₀₁</i>	1,697	1,688	1,688	1,697	1,688	1,688	1,696	1,687	1,687	1,701	1,691	1,691
<i>2n₀₃</i>	1,871	1,876	1,876	1,872	1,873	1,873	1,871	1,871	1,871	1,873	1,876	1,876
<i>2n₀₅</i>	1,852	1,845	1,845	1,852	1,845	1,845	1,852	1,845	1,845	1,853	1,846	1,846
<i>2n₀₇</i>	1,829	1,824	1,824	1,830	1,824	1,824	1,829	1,824	1,824	1,832	1,827	1,827
<i>π_{C3-C4}</i>	1,644			1,641			1,641			1,655		
<i>π_{C5-C6}</i>	1,726	1,727	1,727	1,726	1,727	1,727	1,726	1,728	1,728	1,725	1,726	1,726
<i>π_{C7-C8}</i>	1,638			1,638			1,638			1,641		
<i>π_{C9-C10}</i>	1,555			1,555			1,554			1,562		
<i>π_{C2-C3}</i>	1,572		1,572	1,573		1,573	1,574		1,574	1,565		1,565
<i>π_{C4-C10}</i>	1,580		1,580	1,580		1,580	1,582		1,582	1,574		1,574
<i>π_{C8-C9}</i>	1,690		1,690	1,689		1,689	1,689		1,689	1,690		1,690
Σ	13,812	13,800	13,800	13,810	13,800	13,800	13,809	13,799	13,799	13,841	13,795	13,795
$\Sigma(*)$	6,563	6,568	6,568	6,560	6,569	6,569	6,560	6,572	6,572	6,582	6,555	6,555
<i>$\pi_{C2-C1'}$</i>	1,505									1,515		
Anillo B												
<i>2n₀₃</i>				1,870	1,866	1,866	1,870	1,866	1,866	1,847	1,843	1,843
<i>2n₀₄</i>	1,817	1,826	1,826	1,825	1,835	1,835	1,835	1,847	1,847	1,802	1,813	1,813
<i>2n₀₅</i>							1,872	1,867	1,867			
<i>$\pi_{C1'-C2}$</i>			1,607	1,575	1,624	1,624	1,615	1,654	1,654	1,621		1,621
<i>$\pi_{C3'-C4'}$</i>			1,567	1,577	1,604	1,604	1,537	1,561	1,561	1,581		1,581
<i>$\pi_{C5'-C6'}$</i>	1,702	1,711		1,687	1,701	1,701	1,700	1,712	1,712	1,699	1,728	1,728
<i>$\pi_{C1'-C6'}$</i>	1,629		1,581		1,641	1,641	1,597	1,669	1,669	1,637		1,637
<i>$\pi_{C2'-C3'}$</i>	1,720	1,701	1,707		1,687	1,687	1,725	1,696	1,696	1,719	1,716	1,716
<i>$\pi_{C4'-C5'}$</i>	1,573		1,597		1,608	1,608	1,560	1,565	1,565	1,586		1,586
Σ	5,240	6,729	6,711	8,557	8,633	8,633	10,445	10,509	10,509	7,067	8,590	8,590
$\Sigma(*)$	3,422	4,903	4,885	4,861	4,932	4,932	4,867	4,929	4,929	3,418	4,934	4,934

(*) Suma de las ocupaciones de los orbitales que contribuyen al sistema electrónico π sin considerar los 2n de los oxígenos.

Al analizar la sumatoria de la población electrónica del sistema π para los anillos A/C, se observan valores similares entre los distintos compuestos (13,795 – 13,841) (**Figura 6.10**), lo cual sugiere que las variaciones en la sustitución del anillo B no tienen un impacto significativo en la deslocalización electrónica de los anillos A/C. Sin embargo, se aprecia una diferencia notable entre los confórmeros **P** (planos) y **Z** (no planos) dentro de cada compuesto (**Figura 6.10**), donde los **P** muestran una población electrónica ligeramente mayor que los **Z**. Las diferencias en la población del sistema π entre los confórmeros **P** y **Z** son de 0,011, 0,010, 0,010 y 0,047 para pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina respectivamente. Este comportamiento coincide con los resultados previos, en los que los confórmeros **Z** tienden a una mayor localización de carga positiva en los anillos A/C que los **P**, lo que indica que la diferencia entre ellos radica más en la distribución de la población electrónica que en la cantidad de carga presente.

Tabla 6.5. Ocupación de los orbitales que miden la población electrónica promedio de los orbitales antienlazantes (π^*_{C-C}) que forman parte del sistema π^* en los anillos A/C y el anillo B, para los confórmeros **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina.

	<i>Pg P</i>	<i>Pg Z1</i>	<i>Pg Z2</i>	<i>Cn P</i>	<i>Cn Z1</i>	<i>Cn Z2</i>	<i>Df P</i>	<i>Df Z1</i>	<i>Df Z2</i>	<i>Pn P</i>	<i>Pn Z1</i>	<i>Pn Z2</i>
BD* 2												
Anillos A/C												
π^*_{C3-C4}	0,304			0,304			0,306			0,300		
π^*_{C5-C6}	0,321	0,311	0,311	0,321	0,311	0,311	0,321	0,310	0,310	0,325	0,314	0,314
π^*_{C7-C8}	0,383			0,383			0,383			0,385		
π^*_{C9-C10}	0,497			0,496			0,497			0,494		
π^*_{C2-C3}		0,368	0,369		0,369	0,369		0,367	0,367		0,379	0,379
π^*_{C4-C10}		0,368	0,367		0,368	0,368		0,366	0,366		0,382	0,382
π^*_{C8-C9}		0,384	0,384		0,385	0,385		0,385	0,385		0,387	0,387
Σ	1,506	1,430	1,431	1,505	1,431	1,431	1,507	1,428	1,428	1,505	1,462	1,462
$\pi^*_{C2-C1'}$	0,496									0,485		
Anillo B												
$\pi^*_{C1'-C2'}$			0,435	0,459	0,436	0,436	0,481	0,452	0,452		0,437	0,437
$\pi^*_{C3'-C4'}$			0,380	0,388	0,372	0,372	0,433	0,424	0,424		0,359	0,359
$\pi^*_{C5'-C6'}$	0,254		0,275	0,321	0,352	0,352	0,357	0,398	0,398	0,301	0,356	0,356
$\pi^*_{C1'-C6'}$		0,445		0,444	0,454	0,454	0,449	0,477	0,477		0,453	0,453
$\pi^*_{C2'-C3'}$	0,243	0,249		0,312	0,329	0,329	0,353	0,376	0,376	0,292	0,334	0,334
$\pi^*_{C4'-C5'}$		0,377		0,372	0,369	0,369	0,418	0,422	0,422		0,356	0,356
Σ	0,497	1,070	1,090	1,148	1,157	1,157	1,245	1,274	1,274	0,593	1,148	1,148

Un comportamiento similar se observa al analizar los orbitales antienlazantes (π^*), con un rango entre 1,428 – 1,507 para la sumatoria de poblaciones de los orbitales antienlazantes en los anillos A/C. La diferencia en la ocupación de estos orbitales entre los conformeros **P** y **Z** es de 0,075, 0,074, 0,079 y 0,043 para pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina respectivamente (**Tabla 6.5**).

Respecto al anillo B, el patrón de sustitución genera cambios en la población electrónica de los orbitales π . El rango de valores observados para las cuatro antocianidinas está comprendido entre 5,240 – 10,509. Las sumatorias de las ocupaciones de los orbitales enlazantes en el sistema π del anillo B muestran menores poblaciones para los conformeros **P** que los **Z** para todos los compuestos, con diferencias de -1,490, -0,076, -0,064 y -1,523 para pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina respectivamente (**Tabla 6.4**). Esta disminución es más pronunciada en pelargonidina y peonidina, y mínima para cianidina y delfinidina, probablemente debido a la presencia de más grupos hidroxilo donantes en estas últimas, lo que favorece una mayor deslocalización electrónica hacia el anillo B.

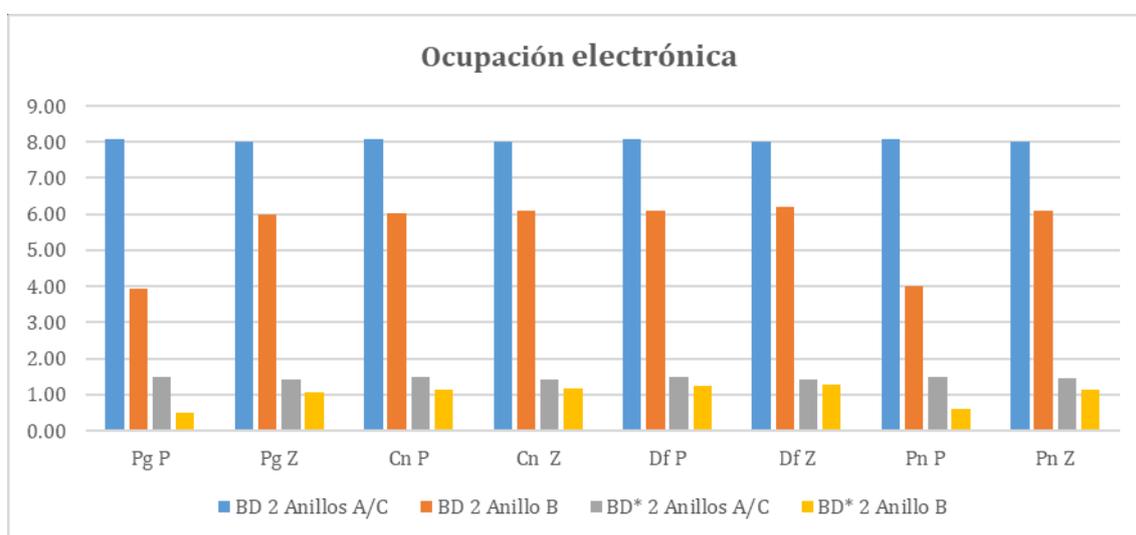


Figura 6.10. Suma de la ocupación de orbitales de enlace (BD) y antienlace (BD*) promedio para el conjunto de anillos A/C y el anillo B, para los conformeros **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina.

En pelargonidina y peonidina, con un solo grupo hidroxilo en la posición 4', la deslocalización electrónica está favorecida, promoviendo la formación de una estructura quinoidal, como se mencionó anteriormente (**Figura 6.5**), con la aparición de dobles enlaces conjugados en lugar de un anillo aromático típico. La sumatoria de la ocupación electrónica de los orbitales antienlazantes para el sistema π en el anillo B, varía el rango 0,497 – 1,157 para todos los compuestos. La diferencia entre los conformeros **P** y **Z** sigue un patrón similar al de los orbitales enlazantes, con diferencias de -0,573, -0,009, -0,029 y 0,555 para pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina respectivamente. Sólo en pelargonidina y peonidina se observa un enlace $\pi_{C2-C1'}$ con ocupación de 1,505 y 1,515 respectivamente, sólo para los conformeros **P** (**Tabla 5.6**). Esto concuerda con lo expuesto anteriormente, donde los conformeros **P** presentan una mayor capacidad para deslocalizar la carga positiva hacia el anillo B que los **Z**. Este comportamiento podría deberse a la disposición espacial planar de los conformeros **P**, que facilita una deslocalización y

transferencia electrónica más efectiva. Para cianidina y delfinidina, esta deslocalización hacia el anillo B no es tan evidente, probablemente por la presencia de grupos hidroxilo adicionales en las posiciones 3' o 3' y 5', lo que refuerza la donación electrónica hacia el anillo B y aumenta su "aromaticidad".

6.5.3. *Estudio de los enlaces C-C*

En la **Figura 6.11** se presentan los valores de elipticidad (ϵ) para los enlaces C-C que conforman los anillos de cada compuesto. Como referencia, se ha incluido la elipticidad del enlace C-C del benceno ($1,99E-01$), calculada al mismo nivel teórico y representada mediante una línea punteada (Dominikowska & Palusiak, 2012).

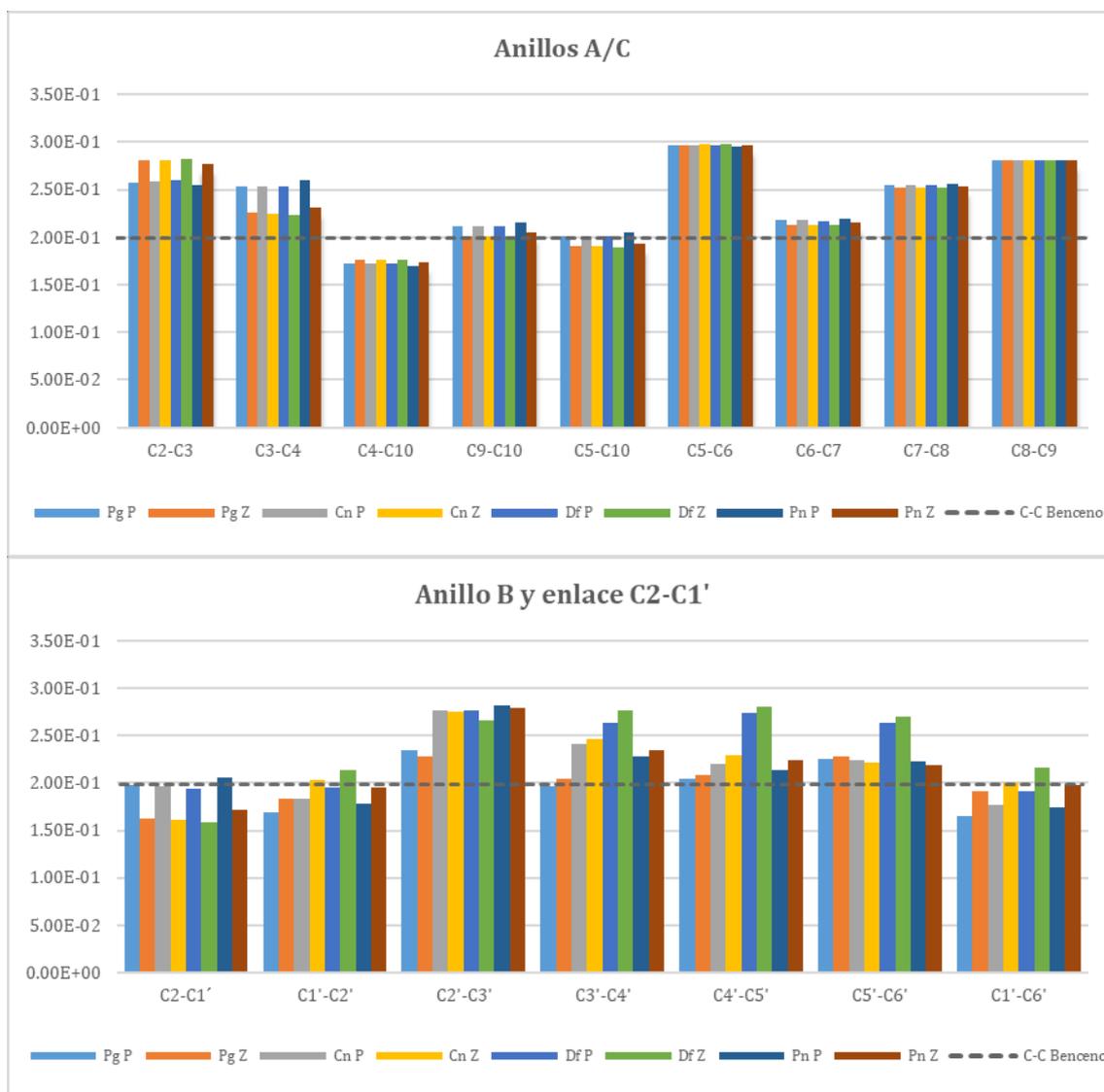


Figura 6.11. Valores promedio de elipticidad (ϵ) para los enlaces de cada anillo, calculados al nivel teórico B3LYP/6-311++G(d,p), para los conformeros **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina. Como referencia, se incluye la elipticidad del enlace C-C del benceno ($1,99E-01$), también calculada al mismo nivel teórico.

En las cuatro antocianidinas, el enlace C5-C6 muestra una elipticidad superior a la del benceno, con valores cercanos a 2,94E-01, 2,97E-01, 2,97E-01 y 2,96E-01 para pelargonidina, cianidina, delphinidina y peonidina respectivamente. Esto concuerda con la representación de las antocianidinas y las dos estructuras quinoidales cargadas positivamente propuestas (**Figura 6.5**), que sugieren un carácter de doble enlace. No se observan diferencias significativas en los valores de elipticidad entre los conformeros **P** y **Z** para este enlace.

Otros enlaces de interés son C7-C8 y C8-C9, que también presentan valores más altos de elipticidad que el benceno. En la **Tabla 6.6** se listan las principales energías de segundo orden ($E^{(2)}$) asociadas al segundo par libre de oxígenos de cada sustituyente para los conformeros más estables de las antocianidinas estudiadas. Se observa una transferencia electrónica $2n_{O7} \rightarrow \pi_{C7-C8}$, lo que promueve un mayor carácter de doble enlace entre C7-C8 y, por tanto, un aumento de la elipticidad en todos los compuestos. Un comportamiento similar se observa en el enlace C5-C6, donde se produce una transferencia $2n_{O5} \rightarrow \pi_{C5-C6}$. Esta deslocalización de carga se ve favorecida por la disposición antiperiplanar del par libre del oxígeno respecto al enlace (Lobayan & Schmit, 2018). En este caso, se aprecia una pequeña diferencia en la elipticidad entre los conformeros **P** y **Z**, con valores de 2,56E-03, 2,52E-03, 2,42E-03 y 2,53E-03 para pelargonidina, cianidina, delphinidina y peonidina respectivamente.

En cuanto al enlace C8-C9, los valores de elipticidad son superiores a los del benceno, con aproximadamente 1,64E-02 para pelargonidina, cianidina, delphinidina, y 1,86E-02 para peonidina. No se observan diferencias significativas entre los conformeros **P** y **Z**. Estos valores sugieren un carácter de doble enlace, similar al de C5-C6, lo que apoya la representación quinoidal de la estructura (**Figura 6.5**). Si consideramos a las antocianidinas como sales de flavilio, el enlace C3-C4 debería también tener un carácter de doble enlace, lo cual se refleja en los valores de elipticidad, con una diferencia significativa entre los conformeros **P** y **Z** (2,81E-02 para pelargonidina y cianidina, 3,01E-02 para delphinidina y 2,85E-02 para peonidina), siendo los valores mayores para los conformeros **P**. Esta diferencia se correlaciona con las deslocalizaciones electrónicas observadas en el análisis NBO (**Tabla 6.6**).

La orientación del grupo HO-3' en los conformeros **P** situando su par libre $2n_{O3}$ en posición antiperiplanar respecto al enlace C3-C4, lo que favorece la transferencia $2n_{O3} \rightarrow \pi_{C3-C4}$. En cambio, en los conformeros **Z**, el grupo HO-3 se orienta hacia el anillo B, favoreciendo la deslocalización hacia el enlace C2-C3 y no hacia C3-C4. Por esta razón, se observa una mayor elipticidad en el enlace C2-C3 en los conformeros **Z** que en los **P** (2,33E-02, 2,27E-02, 3,25E-02 y 2,20E-02 para pelargonidina, cianidina, delphinidina y peonidina respectivamente). Esto refuerza la representación de las estructuras quinoidales cargadas positivamente (**Figura 6.5**), donde los conformeros **P** muestran una mayor representación de la primera estructura quinoidal, mientras que los conformeros **Z** se inclinan hacia la segunda estructura quinoidal.

Tabla 6.6. Energías de segundo orden asociadas a las transferencias de carga que justifican el mayor carácter de doble enlace en los distintos enlaces C-C, calculadas al nivel teórico B3LYP/6-311++G(d,p). Los valores se expresan en kcal/mol.

<i>Donor</i>	<i>Aceptor</i>	<i>Pg P CT d</i>	<i>Pg P CT u</i>	<i>Pg P CC d</i>	<i>Pg P CC u</i>
<i>2n₀₁</i>	$\pi^*_{C2-C1'}$	34,74	34,68	35,26	35,21
	π^*_{C9-C10}	31,24	31,21	31,03	31
<i>2n₀₃</i>	π^*_{C3-C4}	29,93	30,12	29,91	30,1
<i>2n₀₅</i>	π^*_{C5-C6}	36,18	36,22	37,13	37,21
<i>2n₀₇</i>	π^*_{C7-C8}	40,11	40,09	37,97	37,99

<i>Donor</i>	<i>Aceptor</i>	<i>Cn P CT tc B</i>	<i>Cn P CT ct A</i>	<i>Cn P CT tc A</i>	<i>Cn P CC tc B</i>	<i>Cn P CC tc A</i>	<i>Cn P CC ct A</i>	<i>Cn P CT ct B</i>	<i>Cn P CC ct B</i>
<i>2n₀₁</i>	$\pi^*_{C2-C1'}$	-	-	-	-	-	-	-	-
	π^*_{C9-C10}	31,31	31,43	30,99	31,13	30,82	31,19	31,46	31,22
<i>2n₀₃</i>	π^*_{C3-C4}	28,16	30,04	30,25	29,39	30,23	29,99	30,46	30,43
<i>2n₀₅</i>	π^*_{C5-C6}	36,12	36,16	36,22	37,07	37,17	37,10	36,27	37,22
<i>2n₀₇</i>	π^*_{C7-C8}	40,07	40,1	39,98	37,94	37,85	37,96	40,12	37,98
<i>2n_{04'}</i>	$\pi^*_{C3'-C4'}$	38,5	-	-	38,58	-	-	34,29	34,3
	$\pi^*_{C4'-C5'}$	-	34,54	38,64	-	38,76	34,64	-	-
<i>2n_{03'}</i>	$\pi^*_{C2'-C3'}$	30,17	33,74	30,91	30,11	30,93	33,77	33,08	33,06

<i>Donor</i>	<i>Aceptor</i>	<i>Df P CT ctt</i>	<i>DF P CC ctt</i>	<i>DF P CT tcc</i>	<i>Df P CC tcc</i>
<i>2n₀₁</i>	$\pi^*_{C2-C1'}$	-	-	-	-
	π^*_{C9-C10}	31,53	31,3	31,25	31,04
<i>2n₀₃</i>	π^*_{C3-C4}	29,52	29,49	30,58	30,55
<i>2n₀₅</i>	π^*_{C5-C6}	36,11	37,05	36,26	37,22
<i>2n₀₇</i>	π^*_{C7-C8}	40,12	37,97	40,04	37,91
<i>2n_{03'}</i>	$\pi^*_{C3'-C4'}$	34,73	34,83	-	-
	$\pi^*_{C2'-C3'}$	-	-	31,38	31,38
<i>2n_{04'}</i>	$\pi^*_{C3'-C4'}$	33,3	33,37		
	$\pi^*_{C4'-C5'}$	-	-	33,32	33,41
<i>2n_{05'}</i>	$\pi^*_{C5'-C6'}$	30,54	30,49		
	$\pi^*_{C4'-C5'}$	-	-	34,68	34,61

<i>Donor</i>	<i>Aceptor</i>	<i>Pn P CT tc B</i>	<i>Pn P CT tc A</i>	<i>Pn P CC tc A</i>	<i>Pn P CC tc B</i>
<i>2n₀₁</i>	$\pi^*_{C2-C1'}$	34,12	33,62	34,09	34,65
	π^*_{C9-C10}	31,33	30,98	30,81	31,11
<i>2n₀₃</i>	π^*_{C3-C4}	29,42	30,21	30,2	29,36
<i>2n₀₅</i>	π^*_{C5-C6}	36,01	36,12	37,09	36,96
<i>2n₀₇</i>	π^*_{C7-C8}	39,86	39,73	37,65	37,76
<i>2n_{03'}</i>	$\pi^*_{C2'-C3'}$	32,73	33,44	33,49	32,67

Un aspecto destacado es el comportamiento del enlace C2-C1'. En los confórmers **P** (planos), los valores de elipticidad son cercanos a los del benceno, lo que indica un posible carácter de doble enlace que favorece la conjugación entre los anillos A/C y B. En los

confórmeros **Z**, sin embargo, los valores son menores, con diferencias de 3,48E-02, 3,51E-02, 3,63E-02 y 3,47E-02 para pelargonidina, cianidina, delfinidina y peonidina respectivamente, lo que sugiere un enlace con mayor carácter simple y una menor deslocalización electrónica en los confórmeros **Z** que en los **P**. Además, se observa una transferencia $2n_{O1} \rightarrow \pi_{C2-C1'}$ para pelargonidina y peonidina, pero no para cianidina y delfinidina (**Tabla 6.6**). Este comportamiento se relaciona con el análisis del sistema electrónico π , donde los grupos donantes en el anillo B promueven una mayor deslocalización en cianidina y delfinidina que en pelargonidina y peonidina, lo que restringe la transferencia $2n_{O1} \rightarrow \pi_{C2-C1'}$ en estos últimos dos compuestos.

El análisis de los enlaces en el anillo B es más complejo, debido a las donaciones electrónicas y las transferencias asociadas a los sustituyentes en este anillo, lo que aumenta la densidad electrónica en los enlaces π adyacentes (Lobayan & Schmit, 2018). En pelargonidina, que es el compuesto más sencillo con un solo grupo hidroxilo, se observan tres patrones principales. Los enlaces C1'-C2' y C1'-C6' muestran valores de elipticidad inferiores a los del benceno (aproximadamente 2,28E-02 y 2,01E-02 respectivamente), con mayores valores de ϵ en los confórmeros **Z** que en los **P**, con diferencias de 1,47E-02 y 2,62E-02 para C1'-C2' y C1'-C6' respectivamente (**Figura 6.11**). En los enlaces C3'-C4' y C4'-C5', adyacentes al grupo HO-4', los valores de elipticidad son similares a los del benceno (alrededor de 2,00E-01 y 2,06E-01). Finalmente, los enlaces C2'-C3' y C5'-C6' muestran valores de elipticidad superiores a los del benceno, con 3,19E-02 y 2,82E-02, lo que sugiere un mayor carácter de doble enlace, consistente con la estructura quinoidal (**Figura 6.5**).

Para el resto de las antocianidinas, los sustituyentes en el anillo B dificultan el análisis. Sin embargo, en todos los compuestos, los enlaces C2'-C3' y C5'-C6' presentan valores de elipticidad superiores a los del benceno (aproximadamente 7,69E-02 y 2,42E-02 en cianidina, 7,28E-02 y 6,80E-02 en delfinidina, y 8,17E-02 y 2,20E-02 en peonidina). Además, los confórmeros **P** de cada antocianidina presentan valores menores de elipticidad que los **Z** en los enlaces C1'-C2' y C1'-C6', con diferencias de 1,88E-02 y 2,34E-02 en cianidina, 1,85E-02 y 2,56E-02 en delfinidina, y 1,83E-02 y 2,37E-02 en peonidina, siguiendo el patrón observado en pelargonidina.

Un aspecto interesante derivado del análisis de las $E^{(2)}$ mostradas en la **Tabla 6.6** es la ausencia de transferencia de carga del $2n_{O4'}$ en pelargonidina y peonidina, a diferencia de lo observado en cianidina y delfinidina. En estos dos últimos compuestos, se identifican dos transferencias: $2n_{O4'} \rightarrow \pi_{C3'-C4'}$ y $2n_{O4'} \rightarrow \pi_{C4'-C5'}$, en función de la disposición del grupo HO-4'. La falta de transferencias en pelargonidina y peonidina sugiere que la ocupación electrónica de este orbital podría estar comprometida, lo que se refleja en valores menores en comparación con cianidina y delfinidina. En la **Tabla 6.7** se muestran los promedios de la ocupación de los pares libres de los oxígenos de los grupos hidroxilo y metoxilo. Mientras que todos los pares libres $1n$ poseen una ocupación electrónica similar, los pares libres $2n$ muestran que el $2n_{O4'}$ tiene la menor ocupación electrónica en las cuatro antocianidinas, siendo especialmente baja en pelargonidina y peonidina en comparación con cianidina y delfinidina. Esto puede estar relacionado con la ausencia de transferencia de carga desde estos orbitales hacia los enlaces C-C adyacentes, así como con una mayor predominancia de la estructura quinoidal en pelargonidina y peonidina respecto a cianidina y delfinidina.

Tabla 6.7. Ocupación electrónica de los orbitales de los pares libres de oxígeno en los distintos grupos hidroxilo y metoxilo.

<i>Ocupación electrónica</i>				
	Pelargonidina	Cianidina	Delfinidina	Peonidina
<i>1n₀₃</i>	1,9738	1,9737	1,9736	1,9736
<i>2n₀₃</i>	1,8715	1,8716	1,8713	1,8731
<i>1n₀₅</i>	1,9753	1,9753	1,9753	1,9754
<i>2n₀₅</i>	1,8517	1,8518	1,8517	1,8529
<i>1n₀₇</i>	1,9760	1,9760	1,9760	1,9761
<i>2n₀₇</i>	1,8293	1,8295	1,8294	1,8320
<i>1n_{03'}</i>		1,9743	1,9751	1,9574
<i>2n_{03'}</i>		1,8704	1,8586	1,8466
<i>1n_{04'}</i>	1,9767	1,9748	1,9738	1,9748
<i>2n_{04'}</i>	1,8083	1,8289	1,8352	1,8022
<i>1n_{05'}</i>			1,9745	
<i>2n_{05'}</i>			1,8837	

6.6. Relación estructura-actividad e importancia del espacio conformacional

6.6.1. *Orbitales moleculares de frontera*

Los orbitales moleculares de frontera se han empleado durante mucho tiempo para evaluar la reactividad y bioactividad comparativa de los compuestos orgánicos (Fleming, 1976; Lewis, 1999). Se componen del orbital molecular ocupado más alto (HOMO) y el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO). Las energías del HOMO y LUMO determinan, por un lado, la facilidad con la que una molécula puede donar electrones (HOMO) y, por otro, su capacidad para aceptar electrones (LUMO). Además, la diferencia (brecha) de energía HOMO-LUMO (ΔE) resulta útil para caracterizar la reactividad química, la bioactividad y la estabilidad cinética de un compuesto (Huang *et al.*, 2017). Una molécula con una brecha de energía HOMO-LUMO pequeña tiende a ser más polarizable y, generalmente, se asocia con una mayor reactividad química, mayor bioactividad y menor estabilidad cinética. La disposición electrónica de los orbitales de frontera en las antocianidinas ofrece una primera aproximación a su capacidad antioxidante, permitiendo identificar los sitios de mayor reactividad y los potenciales mecanismos de estabilización electrónicos.

Se calcularon las diferencias de energía entre los orbitales HOMO y LUMO para el espacio conformacional de las seis antocianidinas en estudio, tanto en vacío como en los tres solventes analizados. Con el aumento de la sustitución en los anillos, se observó una disminución de la brecha energética HOMO-LUMO, lo que indica un incremento en la

reactividad química y la bioactividad de las moléculas, tanto en vacío como en solución (**Tabla 6.8**). Este comportamiento también fue consistente con las tendencias observadas previamente en el análisis del momento dipolar aparente y los valores de polarizabilidad.

Se determinó que los confórmeros planos son más reactivos, ya que presentan menor brecha HOMO-LUMO que los no planos, tanto en vacío como en los tres solventes analizados. Para obtener una representación más completa del espacio conformacional, se utilizaron promedios estadísticos basados en la distribución de Maxwell-Boltzmann, lo que permitió evaluar los valores promedio de las brechas HOMO-LUMO (E_{gap}) considerando la contribución de todos los confórmeros, con el fin de precisar la reactividad de cada compuesto. Los resultados obtenidos para todo el espacio conformacional, junto con los valores obtenidos al considerar únicamente el confórmero más estable, se presentan en la **Tabla 6.8**.

Tabla 6.8. Energías de los orbitales HOMO y LUMO, y diferencia de energía HOMO-LUMO para los confórmeros más estables en vacío, ácido acético, metanol y agua, expresadas en electronvoltios (eV).

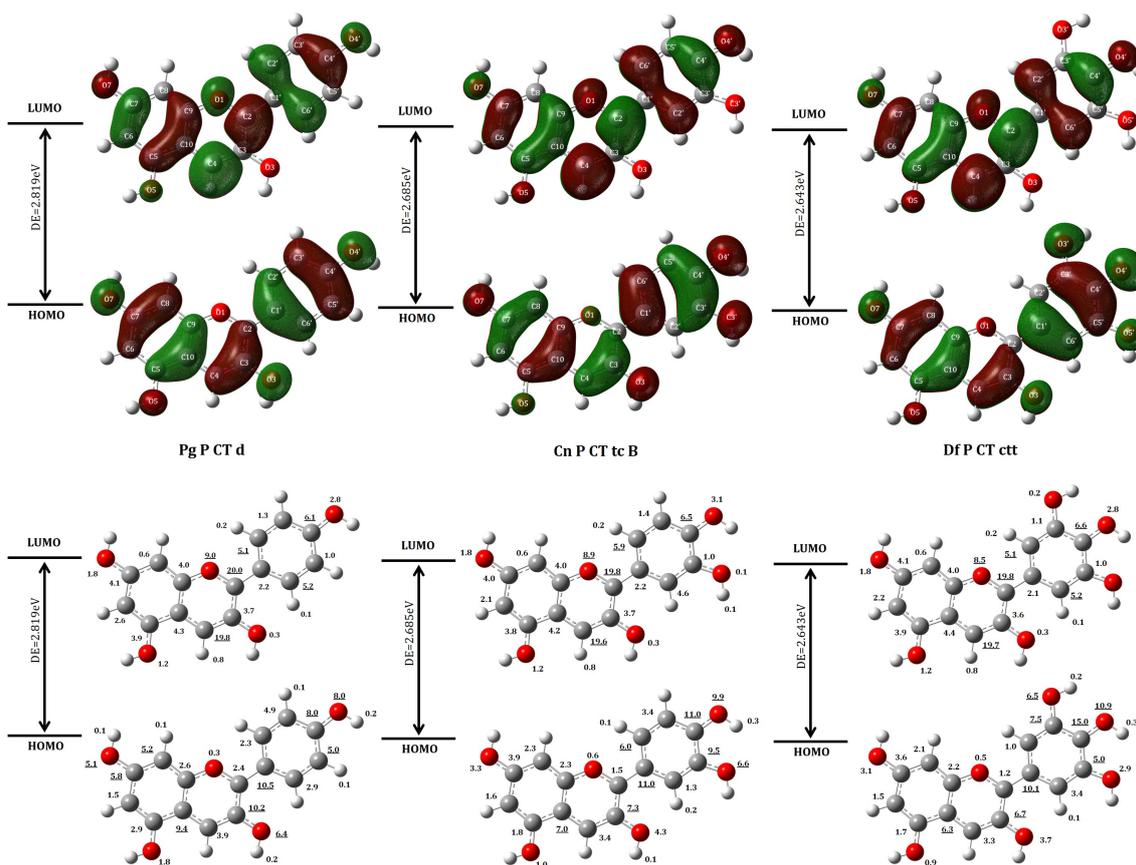
	HOMO	LUMO	LUMO-HOMO	E_{gap}*
Vacío				
<i>Pg P CT d</i>	-9,447	-6,628	2,819	2,828
<i>Cn P CT tc B</i>	-9,315	-6,630	2,685	2,694
<i>Df P CT ctt</i>	-9,273	-6,630	2,643	2,638
<i>Pn P CT tc B</i>	-9,185	-6,550	2,634	2,657
<i>Pt P CT ctt A</i>	-9,145	-6,558	2,586	2,596
<i>Mv P CT ttt</i>	-8,962	-6,464	2,498	2,491
Ácido acético				
<i>Pg P CT d</i>	-6,973	-4,062	2,911	2,904
<i>Cn P CT tc B</i>	-6,867	-4,079	2,788	2,799
<i>Df P CT ctt</i>	-6,861	-4,098	2,763	2,763
<i>Pn P CT tc A</i>	-6,794	-4,044	2,750	2,754
<i>Pt P CT ctt A</i>	-6,791	-4,070	2,722	2,724
<i>Mv P CT ttt</i>	-6,540	-3,998	2,543	2,592
Metanol				
<i>Pg P CT d</i>	-6,597	-3,669	2,929	2,923
<i>Cn P CT tc A</i>	-6,511	-3,681	2,831	2,827
<i>Df P CT ctt</i>	-6,504	-3,708	2,796	2,796
<i>Pn P CT tc A</i>	-6,454	-3,655	2,800	2,793
<i>Pt P CT ctt B</i>	-6,444	-3,683	2,761	2,754
<i>Mv P CT ttt</i>	-6,342	-3,658	2,683	2,676
Agua				
<i>Pg P CT d</i>	-6,545	-3,614	2,931	2,927
<i>Cn P CT tc A</i>	-6,461	-3,626	2,836	2,843
<i>Df P CT ctt</i>	-6,455	-3,654	2,801	2,801
<i>Pn P CT tc A</i>	-6,412	-3,612	2,800	2,793
<i>Pt P CT ctt B</i>	-6,370	-3,626	2,745	2,753
<i>Mv P CT ttt</i>	-6,260	-3,597	2,663	2,661

*Brecha de energía HOMO-LUMO calculada considerando las contribuciones de todos los confórmeros en el espacio conformacional completo.

Este enfoque de considerar todo el espacio conformacional, permite una mejor aproximación teórica al comportamiento experimental, ya que evita las limitaciones asociadas con la evaluación de propiedades basada únicamente en el conformero más estable. Como resultado, los valores obtenidos para el conformero más estable difirieron de los calculados para todo el espacio conformacional. Por ejemplo, en vacío y en solventes, se observaron sobreestimaciones en delphinidina y malvidina, mientras que para el resto de las antocianidinas se detectaron subestimaciones.

Al comparar las seis antocianidinas, malvidina presentó la menor brecha energética HOMO-LUMO, lo que sugiere una mayor reactividad química. Además, al diferenciar las antocianidinas en hidroxiladas y metoxiladas, se observó que, al aumentar la sustitución en el anillo B, la brecha HOMO-LUMO disminuye tanto en vacío como en solución, confirmando la influencia de los grupos funcionales en la reactividad molecular.

Se generaron isosuperficies de los orbitales HOMO y LUMO para los conformeros de cada antocianidina. Dado que las isosuperficies eran muy similares entre sí, en la **Figura 6.12** y **Figura 6.13** se muestran únicamente las correspondientes al conformero plano y no plano más estable de cada antocianidina. Estas transiciones representan el paso de μ (estado fundamental) a μ^* (estado excitado).



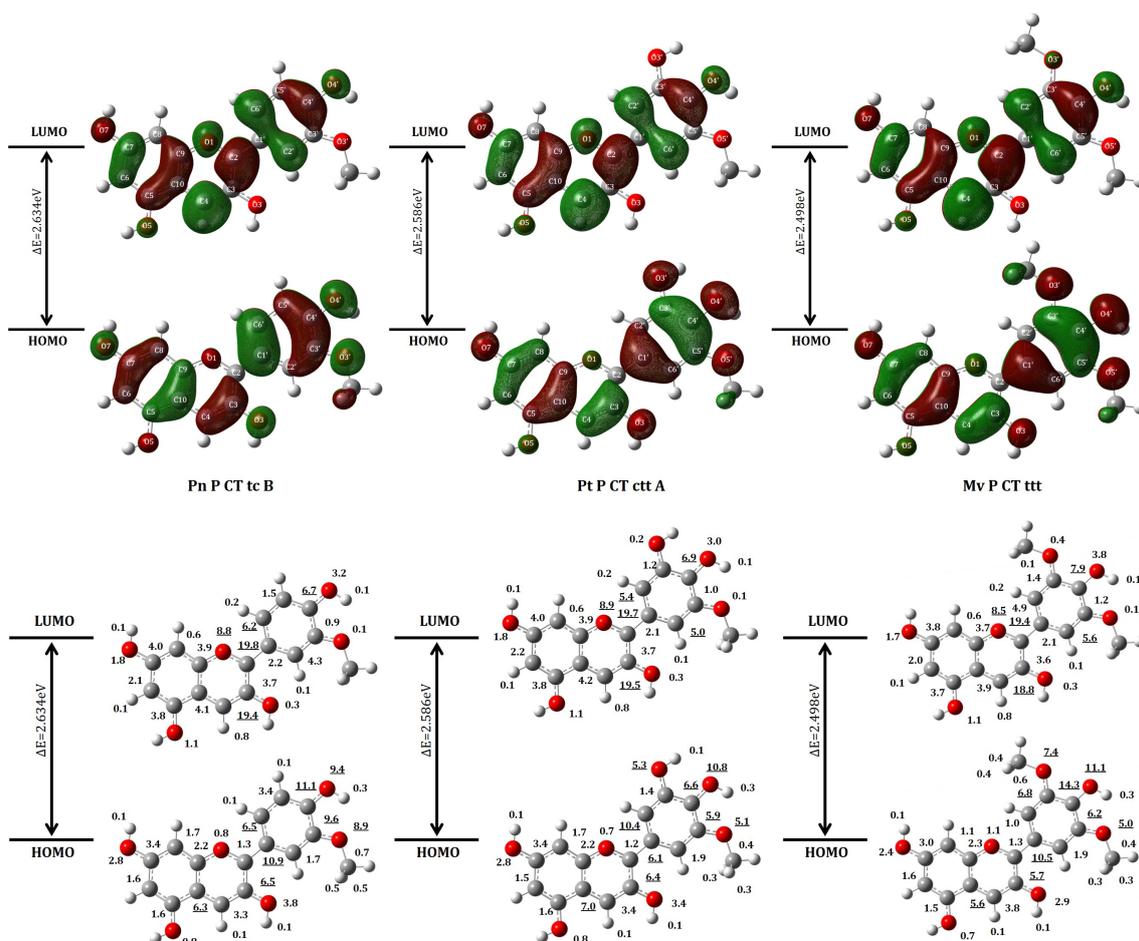
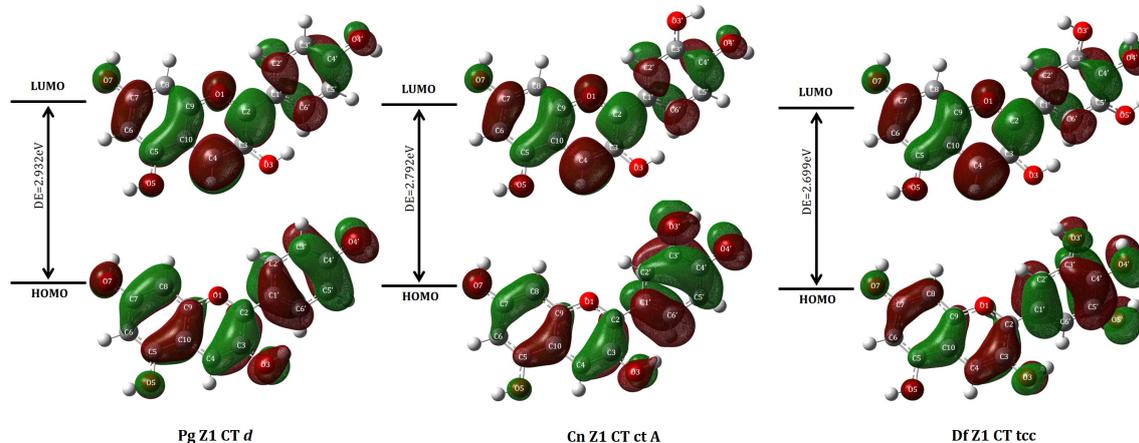


Figura 6.12. Diagramas de contorno y porcentajes de contribución de los principales átomos al HOMO y LUMO de los conformeros planos (P) más estables, optimizados mediante el nivel de teoría B3LYP/6-311++G**.

Adicionalmente, se seleccionaron los conformeros planos (P) y no planos (Z) más estables de cada antocianidina para estudiar la composición de los orbitales HOMO y LUMO, determinando las contribuciones atómicas específicas para cada orbital (**Figura 6.12** y **Figura 6.13**). Sólo se incluyeron las contribuciones atómicas mayores al 0,1%.



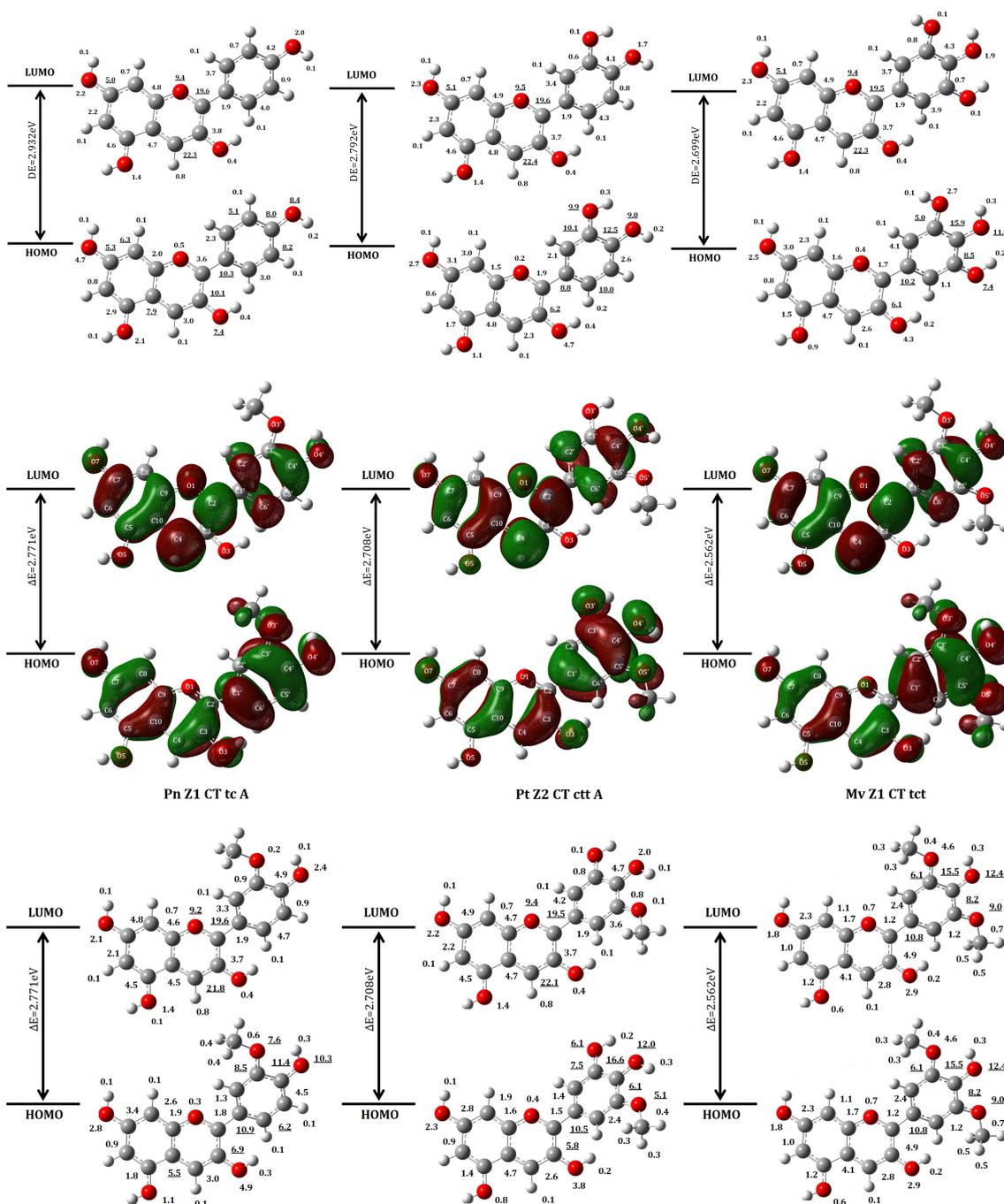


Figura 6.13. Diagramas de contorno y porcentajes de contribución de los principales átomos al HOMO y LUMO de los conformeros no planos (**Z**) más estables, optimizados mediante el nivel de teoría B3LYP/6-311++G**.

Se observó que el orbital LUMO estaba distribuido en toda la molécula en las seis antocianidinas, tanto para los conformeros planos como no planos, con una mayor contribución (>5%) de los átomos **C-4**, **C-2**, **O-1**, **C-2'**, **C-6'** y **C-4'** en todos los casos. Por otro lado, las contribuciones atómicas al orbital HOMO mostraron diferencias significativas entre las antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas:

- **Antocianidinas hidroxiladas:** HOMO mostró contribuciones predominantes de los átomos **O-7**, **C-7**, **C-8**, **C-10**, **C-3**, **O-3**, **C-1'**, **C-4'**, **O-4'**, **C-5'**, **O-3'** y **O-5'**, lo que indica una deslocalización electrónica en los tres anillos (A, B y C).

• **Antocianidinas metoxiladas:** HOMO presentó una mayor contribución de los átomos **C-10, C-3, C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', O-3', O-4' y O-5'**, con una localización preferencial en los anillos B y C.

Estas diferencias sugieren que la reactividad de las antocianidinas está modulada por mecanismos distintos. En las antocianidinas hidroxiladas, la deslocalización del orbital HOMO a través de los tres anillos podría favorecer interacciones electrónicas más distribuidas, mientras que, en las metoxiladas, la localización del HOMO en los anillos B y C podría estar relacionada con una mayor especificidad en las interacciones químicas. Este comportamiento abre la puerta a análisis complementarios y paralelos para comprender los mecanismos de reactividad y bioactividad en cada tipo de antocianidina.

6.6.2. *Actividad antioxidante: Relación con las propiedades estructurales y electrónicas de antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas*

La actividad antioxidante de las antocianidinas es una de las propiedades biológicas que las convierte en compuestos relevantes en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (ver Capítulo 3). Su eficiencia antioxidante está intrínsecamente relacionada con sus propiedades estructurales y electrónicas, como la brecha energética HOMO-LUMO, el momento dipolar, la polarizabilidad y la distribución electrónica en los distintos sitios reactivos de la molécula.

6.6.2.1. Antocianidinas hidroxiladas: Influencia de la brecha energética y la distribución electrónica

En las antocianidinas hidroxiladas (pelargonidina, cianidina y delphinidina), la actividad antioxidante se correlaciona directamente con la brecha energética HOMO-LUMO. Cuanto menor es esta brecha, mayor es la reactividad molecular, lo que incrementa su capacidad para donar electrones y neutralizar radicales libres. En este sentido, pelargonidina presentó la mayor brecha energética, seguida por cianidina y, finalmente, delphinidina, en un orden decreciente de reactividad: **delphinidina > cianidina > pelargonidina**.

Este resultado teórico coincide con los valores experimentales de la actividad antioxidante documentados por Kähkönen y Heinonen (2003), quienes demostraron que delphinidina es la más eficiente en la eliminación de radicales libres, seguida por cianidina y, finalmente, pelargonidina (**Tabla 6.9**).

El análisis de los orbitales moleculares muestra que el O-4' es el sitio más reactivo en las tres antocianidinas hidroxiladas (**Figuras 6.12 y 6.13**). Asimismo, los valores de polarizabilidad y momento dipolar confirman el orden de actividad antioxidante observado, dado que estos parámetros reflejan la facilidad de deslocalización de carga electrónica y la separación de cargas en la molécula.

Por otro lado, los confórmeros planos (**P**), caracterizados por menores brechas energéticas HOMO-LUMO, son más reactivos que los confórmeros no planos (**Z**), lo que

explica por qué los primeros contribuyen en mayor medida a la actividad antioxidante de las antocianidinas hidroxiladas.

Tabla 6.9. Porcentaje de eliminación de radicales libres y concentración inhibitoria media (IC₅₀) del CYP4A5 para las antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas.

	DPPH• (%)	IC ₅₀ (μM)
Hidroxiladas		
<i>Pelargonidina</i>	31	12,2
<i>Cianidina</i>	33	20,8
<i>Delfinidina</i>	42	46,5
Metoxiladas		
<i>Peonidina</i>	33	16
<i>Petunidina</i>	10	23,4
<i>Malvidina</i>	24	14

6.6.2.2. Antocianidinas metoxiladas: Efectos del grado de sustitución y comportamiento redox

A diferencia de las antocianidinas hidroxiladas, en las antocianidinas metoxiladas (peonidina, petunidina y malvidina), la relación entre la estructura química y la actividad antioxidante es más compleja y no depende únicamente del número de grupos hidroxilo en el anillo B. Si bien un mayor grado de hidroxilación aumenta la actividad antioxidante en flavonoides (Sordon *et al.*, 2019), en el caso de las antocianidinas metoxiladas, la presencia de grupos metoxilo modifica significativamente el potencial redox de la molécula.

El grupo HO-4' desempeña un papel clave en este mecanismo. Peonidina con H₃CO-3' y HO-4' presenta una mayor actividad antioxidante que petunidina y malvidina. En estas últimas, la proximidad del HO-4' a otros grupos (metoxilos o hidroxilos) afecta su acidez y, por consiguiente, el comportamiento redox de la molécula (Janeiro & Brett, 2007). La actividad antioxidante de las antocianidinas metoxiladas sigue el siguiente orden: **peonidina > malvidina > petunidina (Tabla 6.9)**.

Este comportamiento puede explicarse mediante el análisis del espacio conformacional de cada antocianidina. La planaridad de los anillos A/C y B favorece la actividad antioxidante, como se ha demostrado para flavonoides en estudios previos (van Acker *et al.*, 1996). En este sentido, peonidina y malvidina muestran una mayor proporción de conformeros planos (**P**) que petunidina, tanto en vacío como en solventes (**Tabla 5.1**).

Además, el análisis de la polaridad del solvente (**Tabla 5.2**) demuestra que la actividad antioxidante aumenta con la polaridad, debido a la mayor contribución relativa de los conformeros planos respecto a los no planos. En contraste con las antocianidinas hidroxiladas, la polarizabilidad no resultó ser un buen predictor de la actividad antioxidante en las antocianidinas metoxiladas.

En conclusión, la comparación entre antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas revela diferencias sustanciales en los mecanismos responsables de su actividad antioxidante. En las antocianidinas hidroxiladas la actividad depende principalmente de la brecha energética HOMO-LUMO y la reactividad del grupo O-4', mientras que en las antocianidinas metoxiladas el efecto redox de los sustituyentes en el anillo B y la proporción de conformeros planos juegan un papel determinante.

6.6.3. Análisis de la actividad antimutagénica de las antocianidinas mediante la inhibición de la enzima CYP3A4

El citocromo P₄₅₀^{3A4} (CYP3A4) es un miembro importante de la superfamilia de enzimas CYP, involucrado en el metabolismo de sustancias endógenas, xenobióticos y fármacos, así como en la síntesis y degradación de hormonas. Esta enzima desempeña una función fundamental en la activación metabólica de mutágenos químicos y carcinógenos, lo que resalta su participación en procesos de carcinogénesis y en la generación de daño genético (Elfaki *et al.*, 2018; Reed *et al.*, 2018). Por lo tanto, la inhibición de CYP3A4 está directamente asociada a una disminución de la actividad mutagénica, constituyendo un mecanismo relevante para el estudio de esta actividad.

Se ha evaluado la actividad antimutagénica de antocianinas, antocianidinas y compuestos relacionados, en base a su capacidad de inhibir la enzima CYP3A4. Los experimentos de acoplamiento molecular revelaron la importancia del ajuste estructural de cada antocianidina en el sitio activo de la enzima para la actividad inhibidora. En este contexto, las interacciones estéricas, electrostáticas y la formación de puentes de hidrógeno juegan un rol central en la bioactividad (Shityakov *et al.*, 2014).

Se observó que la unidad de benzopirilio (anillos A/C) participa predominantemente en interacciones estéricas y orbitales con la enzima, particularmente en el caso de pelargonidina, identificada como el inhibidor más eficaz de CYP3A4. En tanto, para cianidina y delfinidina, el anillo B interviene significativamente en interacciones electrostáticas y orbitales μ . En el sitio activo de la enzima, se identificó una interacción π - π (complejo π) entre fenilalanina y los anillos aromáticos de las antocianidinas, como el observado entre Phe447 y el anillo A de pelargonidina, y entre Phe435 y el anillo B de cianidina. Además, el HO-4' del anillo B de cianidina forma un puente de hidrógeno con el aminoácido Pro434 (Shityakov *et al.*, 2014).

Los estudios de los orbitales moleculares de frontera permitieron explicar la reactividad de estos compuestos en función de la participación de los sustituyentes en el benzopirilio y el anillo B. Las contribuciones porcentuales de los átomos a los orbitales HOMO (**Figura 6.12** y **Figura 6.13**) mostraron que, a medida que aumenta la sustitución en el anillo B, la actividad inhibidora de CYP3A4 disminuye en el orden pelargonidina > cianidina > delfinidina. En detalle, la contribución de C-4' y O-4' aumenta con el grado de sustitución del anillo B, mientras que las contribuciones atómicas disminuyen según la secuencia: C-3/O-3 > C-7/O-7 > C-5/O-5. Este comportamiento también se observa en los carbonos C-10 y C-4, donde C-10 > C-4.

Pelargonidina presenta el menor valor ($IC_{50} = 12,2 \mu M$), seguido por cianidina ($IC_{50} = 20,8 \mu M$) y delfinidina ($IC_{50} = 46,5 \mu M$) (**Tabla 6.9**). Estos resultados sugieren que pelargonidina posee la mayor actividad antimutagénica, seguida por cianidina y delfinidina, en un orden decreciente: **pelargonidina > cianidina > delfinidina**. Este comportamiento coincide con las contribuciones atómicas observadas y la naturaleza de las interacciones enzimáticas identificadas mediante acoplamiento molecular.

Adicionalmente, los estudios indicaron que los confórmeros planos (**P**) muestran brechas energéticas HOMO-LUMO menores que los no planos (**Z**), lo que sugiere una mayor reactividad de los confórmeros **P**. En consecuencia, estos confórmeros presentaron una mayor actividad antimutagénica.

Por último, el estudio del efecto estérico de los sustituyentes en el anillo B mediante mapas de contorno confirmó que el aumento del volumen de estos grupos mejora la capacidad de inhibición de CYP3A4 (Shityakov *et al.*, 2014). De esta forma, los valores de IC_{50} obtenidos mostraron que malvidina ($IC_{50} = 14 \mu M$) fue el inhibidor más eficaz entre las antocianidinas metoxiladas, seguida por peonidina ($IC_{50} = 16 \mu M$) y petunidina ($IC_{50} = 23,4 \mu M$), en el orden **malvidina > peonidina > petunidina** (**Tabla 6.9**). Este resultado coincide con las contribuciones atómicas al HOMO (**Figura 6.12** y **Figura 6.13**) y el efecto estérico observado.

En conclusión, la actividad antimutagénica de las antocianidinas está intrínsecamente relacionada con su capacidad de inhibir a la enzima CYP3A4, mecanismo que depende de las interacciones estéricas, electrostáticas y la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de las antocianidinas y los aminoácidos de la enzima. El análisis de los orbitales moleculares de frontera proporcionó información crucial para entender la influencia de la estructura electrónica y estérica en esta bioactividad. Los resultados obtenidos respaldan que pelargonidina y malvidina son los inhibidores más potentes de CYP3A4 y, por lo tanto, poseen la mayor actividad antimutagénica.

6.7. Conclusiones del Capítulo 6

En este Capítulo se realizó una caracterización integral del espacio conformacional de las antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas, evaluando sus propiedades estructurales y electrónicas tanto en vacío como en presencia de solventes (ácido acético, metanol y agua). Uno de los aspectos relevantes fue la caracterización de estructuras del tipo quinoidal cargadas positivamente dentro del espacio conformacional, las cuales contribuyen significativamente a la deslocalización electrónica y a la estabilidad de los sistemas analizados. Este análisis permitió comprender mejor las relaciones entre la estructura molecular y las propiedades electrónicas de las antocianidinas.

El estudio de propiedades electrónicas como el momento dipolar aparente, la polarizabilidad y las energías HOMO-LUMO permitió identificar tendencias consistentes con el grado de sustitución en el anillo B. Se observó que un mayor número de sustituyentes está asociado con una disminución en la brecha HOMO-LUMO, lo que implica un incremento en la reactividad química y la bioactividad potencial. Estos resultados fueron consistentes

tanto en vacío como en los solventes evaluados, lo que reafirma la influencia de la estructura molecular sobre las propiedades electrónicas.

La influencia de los solventes se evidenció tanto en la estabilidad general de las estructuras como en las poblaciones relativas de los confórmeros. Se observó que los solventes polares favorecen conformaciones específicas y contribuyen al ajuste de las propiedades electrónicas, lo que refuerza la capacidad de las antocianidinas para interactuar eficazmente en medios polares, características que respaldan su potencial bioactivo.

Por último, este estudio destacó la importancia de considerar el espacio conformacional completo mediante promedios estadísticos basados en la distribución de Maxwell-Boltzmann. Se logró así obtener una representación más precisa y completa de las propiedades estructurales y electrónicas, evitando sesgos derivados de evaluar únicamente el confórmero más estable. De esta manera, los resultados obtenidos proporcionan una aproximación teórica más cercana al comportamiento experimental esperado.

Capítulo 7. Estudio de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de las actividades antioxidante, antimutagénica y anticarcinogénica de las antocianinas

7.1. Estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR)

Desde hace décadas, ha existido un creciente interés por predecir diversas propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacológicas de sustancias en estudio. Este interés ha impulsado la aplicación de métodos derivados de la Mecánica Cuántica, con el objetivo de representar de manera más precisa y realista los fenómenos implicados. Sin embargo, la dificultad inherente a esta aproximación radica en la necesidad de describir exhaustivamente todas las interacciones presentes en el sistema físico de partículas, lo que actualmente está lejos de ser alcanzable. Si bien los cálculos obtenidos a partir de la teoría mecano-cuántica aportan una comprensión de los aspectos mecanísticos que subyacen en una propiedad determinada, no ofrecen una explicación directa sobre cómo los cambios en la estructura química de una sustancia influyen en sus propiedades macroscópicas.

Cuando el objetivo es predecir y cuantificar alguna propiedad macroscópica de moléculas en interacción, basada en cambios en su estructura, resulta indispensable recurrir a las formulaciones de las Relaciones Cuantitativas Estructura-Propiedad (QSPR, *Quantitative Structure-Property Relationships*) y Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationships*). Estas formulaciones son especialmente útiles cuando se dispone de información estructural de las sustancias en cuestión, ya que permiten predecir valores experimentales de propiedades específicas mediante el desarrollo de modelos. Estos modelos combinan herramientas de estadística matemática con métodos de química computacional. Así, se puede concluir que la estructura de una molécula es el factor determinante en la definición de sus propiedades químicas, fisicoquímicas, biológicas o farmacológicas.

7.1.1. Relación de Estructura-Actividad (SAR)

Los estudios conocidos como Relación de Estructura-Actividad (SAR, *Structure-Activity Relationship*) buscan comprender y predecir cómo varía la actividad de un compuesto en función de cambios en su estructura química. Uno de los principios fundamentales de estos estudios es el de *similaridad estructural*, que establece que moléculas con estructuras similares tienden a presentar propiedades similares, mientras que aquellas con estructuras diferentes exhiben propiedades distintas (Johnson & Maggiora, 1990). Si bien desde hace tiempo se reconoce que diferentes sustancias tienen distintos efectos biológicos, los avances en la determinación estructural han permitido formalizar y estabilizar estas relaciones, evidenciando cómo ciertos cambios en la estructura química de un compuesto pueden alterar su actividad biológica (Carbó-Dorca *et al.*, 2000).

7.1.2. La teoría QSAR/QSPR

El estudio pionero sobre las relaciones estructura-actividad fue publicado en 1962 por Hansch, Maloney y Fujita, estableciendo una correlación entre los reguladores del crecimiento de las plantas, las constantes de Hammett y la hidrofobicidad. Este trabajo relacionó propiedades fisicoquímicas con actividades biológicas dentro de un marco que posteriormente se conoció como el Análisis de Hansch (Hansch *et al.*, 1995; Franke & Gruska, 2003). Dos años más tarde, en 1964, Free y Wilson propusieron un modelo basado en contribuciones aditivas de los sustituyentes químicos a la actividad biológica, dependiendo de la presencia o ausencia de los mismos. Este modelo se fundamentaba en la hipótesis de que cada sustituyente tiene un efecto aditivo y constante sobre la actividad biológica, independientemente de la presencia de otros sustituyentes, denominándose a este enfoque como “*de novo*” (Kubinyi, 1988; Franke & Gruska, 2003). Estos dos estudios fueron determinantes para sentar las bases del campo de conocimiento que hoy se conoce como QSAR/QSPR.

El término QSAR se refiere al desarrollo de correlaciones matemáticas entre una respuesta y ciertas características químicas definidas (descriptores moleculares, huellas digitales moleculares) del conjunto de moléculas analizadas. Dependiendo de la naturaleza de la respuesta modelada, pueden identificarse diferentes tipos de estudios específicos, a los cuales se les atribuyen nombres distintos. Estos estudios se agrupan en dos grandes categorías: relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) y relaciones cuantitativas estructura-propiedad (QSPR). No obstante, cuando se abordan respuestas más específicas, también pueden utilizarse otros términos, como por ejemplo (Kaliszan, 2007; Todeschini & Consonni, 2009; Roy *et al.*, 2015a; Rojas *et al.*, 2016):

- Relaciones cuantitativas forma-actividad (QShAR).
- Relaciones cuantitativas estructura-toxicidad (QSTR).
- Relaciones cuantitativas similaridad-actividad (QSiAR).
- Relaciones cuantitativas estructura-citotoxicidad (QSCR).
- Relaciones cuantitativas estructura-reactividad (QSRR).
- Relaciones cuantitativas propiedad-propiedad (QPPR).
- Relaciones cuantitativas estructura-dulzor relativo (QSRSR).
- Relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR).
- Relaciones cuantitativas propiedad-actividad (QPAR).
- Relaciones cuantitativas actividad-actividad (QAAR).
- Relaciones cuantitativas toxicidad-toxicidad (QTTR).

Estos tipos específicos de estudios, que permiten predecir la actividad de moléculas nuevas o hipotéticas en función de sus características moleculares, se engloban dentro de la teoría QSAR. Matemáticamente, la teoría QSAR puede representarse de la siguiente manera (Todeschini & Consonni, 2009; Hongmao, 2015; Roy *et al.*, 2015a) **(Ecuación 7.1)**:

$$\boxed{\text{Actividad/Propiedad Biológica} = f(\text{Estructura Química})}$$

(Ecuación 7.1)

Las moléculas a estudiar presentan propiedades fisicoquímicas determinadas experimentalmente (como la presión de vapor, densidad, entre otras) y características teóricas derivadas de su estructura química (descriptores moleculares y huellas digitales moleculares). Esta información teórica juega un papel crucial en el desarrollo de modelos QSAR/QSPR, como se ilustra en la **Figura 7.1**. La expresión matemática general mencionada puede aplicarse tanto en modelos continuos (*regresión*) como en modelos discretos (*clasificación*) (Chaudhry *et al.*, 2007; Todeschini & Consonni, 2009; Hongmao, 2015; Liaw & Svetnik, 2015).

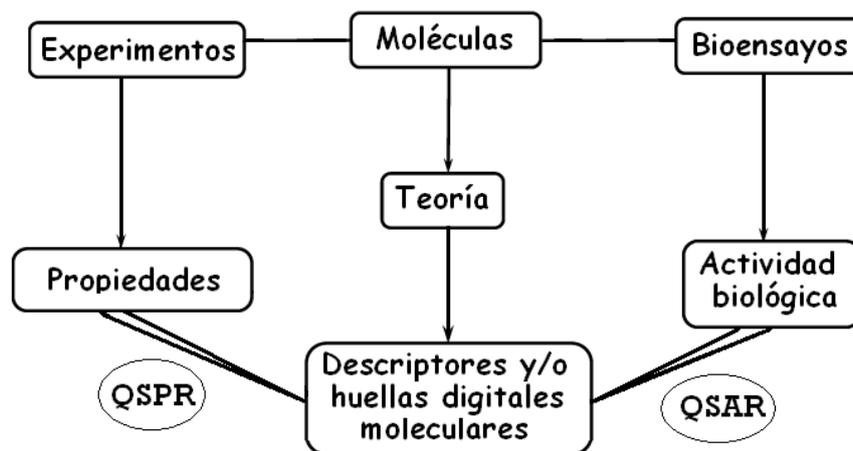


Figura 7.1. Esquema general de un estudio QSAR/QSPR.

Si la actividad o propiedad puede tomar cualquier valor dentro de una escala continua, el modelo es de tipo *regresión*. En cambio, en los modelos de *clasificación*, la actividad se representa en categorías no ordenadas. En estos casos, el equilibrio entre las clases es crucial para la calidad del modelo, ya que suelen sesgarse hacia la clase más numerosa. Por ello, es habitual que el grupo de calibración se diseñe teniendo en cuenta la proporción relativa de cada clase (Hongmao, 2015).

7.1.3. Objetivos de un modelo QSAR

El principal objetivo de un modelo QSAR es generar una representación matemática con capacidad predictiva y, a su vez, permitir una interpretación racional de la información química involucrada. Para desarrollar dicho modelo, es necesario contar con datos sobre una propiedad o actividad determinada de un conjunto de moléculas, lo que permite predecir dicha propiedad o actividad en un conjunto mayor (Hamzeh-Mivehroud *et al.*, 2015). De este modo, el desarrollo de modelos QSAR no sólo resulta útil en la investigación, sino que adquiere gran relevancia en otros campos donde es importante predecir las propiedades o actividades de compuestos químicos (Cronin, 2010; Roy *et al.*, 2015a).

En el marco de nuestro estudio, existe escasa bibliografía sobre estudios QSAR aplicados a antocianinas (Jing *et al.*, 2014; Shityakov *et al.*, 2014), a pesar del creciente

interés en los últimos años por investigar sus propiedades y actividades biológicas. Esto pone de manifiesto que esta área de investigación aún no ha sido explotada en su totalidad.

Las teorías QSAR y QSPR son herramientas fundamentales para el análisis de sustancias que requieren procedimientos complejos, ya sea por su inestabilidad, toxicidad, dificultad de acceso o costo elevado, o por el tiempo que demanda su síntesis. A mayor precisión en la descripción de la estructura molecular, más precisa será la extrapolación de información de una serie de moléculas a otra. Otra aplicación destacada de esta teoría es el uso de los datos obtenidos para el diseño y optimización de compuestos en la industria farmacéutica y, en general, para inferir mecanismos de reacción en compuestos orgánicos (Cronin, 2010; Roy *et al.*, 2015b).

7.1.4. Aplicación de la teoría QSAR

Las áreas de aplicación de la teoría QSAR han experimentado un crecimiento significativo a lo largo del tiempo, abarcando una amplia variedad de campos científicos. Este tipo de modelo se ha consolidado como una herramienta clave para el monitoreo racional de las propiedades y actividades de los compuestos químicos, resultando de gran utilidad en diversas disciplinas. Las aplicaciones de los modelos QSAR pueden agruparse de distintas maneras (Roy *et al.*, 2015a).

Desde la perspectiva de la naturaleza de la respuesta, las aplicaciones se clasifican en tres categorías: actividad, propiedad y toxicidad. Si se considera la naturaleza de los compuestos químicos, se pueden diferenciar entre aquellos beneficiosos para la salud, los utilizados en procesos industriales y de laboratorio, y los que presentan efectos nocivos. De manera más específica, las áreas de aplicación de la teoría QSAR se subdividen en tres grandes categorías: diseño de fármacos, ciencia de los materiales y toxicología predictiva.

En el campo de Diseño de Fármacos, el modelado ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) permite evaluar el perfil farmacocinético de un compuesto potencial antes de su síntesis, optimizando así el proceso de desarrollo dentro de sistemas biológicos. En cuanto a su aplicación en la Ciencia de los Materiales, la teoría QSAR se utiliza en el estudio de polímeros, líquidos iónicos, catálisis, nanomateriales, fullerenos, surfactantes, biomateriales, cerámicos, entre otros. Finalmente, en Toxicología Predictiva, la teoría QSAR se aplica para evaluar la toxicidad sistémica (sobre órganos específicos) y los riesgos ecotoxicológicos de los compuestos en estudio, contribuyendo al control de daños en el ecosistema.

7.1.5. El modelo QSAR

El desarrollo de un modelo QSAR implica la recopilación de datos cuantitativos, en combinación con técnicas quimiométricas apropiadas. Los datos cuantitativos de los compuestos químicos pueden obtenerse de manera experimental, mediante la medición de la actividad o propiedad de interés, o a través de la información química codificada en descriptores moleculares. Estos descriptores derivan de diversas teorías que representan

las moléculas, y dada la gran cantidad de información generada, es esencial el uso de herramientas computacionales para el procesamiento de los datos. Todo modelo QSAR sigue una serie de pasos sistemáticos a lo largo de su desarrollo (Roy *et al.*, 2015b; Golbraikh *et al.*, 2017).

El primer paso en un estudio QSAR es la organización de los compuestos químicos con una respuesta de interés conocida (actividad o propiedad). Un aspecto crucial en esta etapa es evitar la dispersión en la escala de los datos, para lo cual suele aplicarse una transformación, generalmente logarítmica, que ajusta los valores numéricos de la actividad a un rango más manejable (habitualmente dentro de 3 o 4 unidades logarítmicas). Asimismo, es esencial una correcta representación de las estructuras químicas para permitir el cálculo de descriptores moleculares (variables independientes), que serán posteriormente correlacionados con la actividad o propiedad de interés. Este proceso es de vital importancia, ya que la calidad de la representación estructural influye directamente en la capacidad predictiva del modelo.

Una vez que los datos han sido organizados, el siguiente paso es su preprocesamiento, que incluye la eliminación de moléculas duplicadas, descriptores con valores faltantes o nulos, y descriptores constantes o casi constantes, así como aquellos que presentan alta correlación entre sí, superando un umbral determinado.

En la construcción de un modelo QSAR predictivo, resulta fundamental la correcta división de la matriz de datos en dos conjuntos: el *grupo de entrenamiento o calibración (cal)* y el *grupo de validación o predicción (val)*. Esta división puede hacerse de manera aleatoria o mediante el uso de técnicas quimiométricas, pero es importante asegurar una distribución homogénea de las moléculas entre los dos conjuntos, ya que ésta impactará directamente en la validez estadística y predictiva del modelo.

El *conjunto de calibración* se utiliza para ajustar el modelo predictivo mediante técnicas de regresión o clasificación, acopladas con métodos de selección de variables. El modelo desarrollado se valida posteriormente mediante procedimientos de *validación interna* o *crucada (cross-validation)*, así como a través de la *validación externa* con los datos del conjunto de validación. Además, es crucial definir el *dominio de aplicabilidad (AD, Applicability Domain)* del modelo, y en algunos casos se pueden emplear otros criterios adicionales para su validación.

Uno de los pasos más importantes en el desarrollo de un modelo QSAR es la interpretación de la información codificada en los descriptores moleculares, una vez que el modelo ha sido validado. Esta información puede utilizarse para explorar mecanismos de acción en los compuestos químicos analizados, así como para diseñar nuevas sustancias con la actividad o propiedad deseada.

7.1.6. *Enfoques específicos QSAR*

En la literatura relacionada con la teoría QSAR, se han propuesto diversos enfoques, denominados de maneras variadas, lo que dificulta la creación de un sistema de clasificación bien definido. Una posible aproximación para clasificar estos enfoques podría basarse en el objetivo a alcanzar, como el diseño de fármacos o el análisis de similaridad molecular, el

tipo de propiedad molecular modelada (como ADME, QSAR ambiental, relaciones lineales de energía de solvatación (LSERs, *Linear Solvation Energy Relationships*) y QSAR binario), los descriptores moleculares empleados (2D QSAR, 3D QSAR y 4D QSAR), o el método matemático o algoritmo computacional utilizado para estimar los parámetros del modelo, como los métodos de contribución de grupos, análisis estructural y técnicas QSAR basadas en grillas (Todeschini *et al.*, 2009).

7.1.7. Principios del modelado QSAR

El objetivo central en el desarrollo de un modelo QSAR es obtener un modelo matemático con capacidad predictiva. Para garantizar la fiabilidad de las predicciones, se deben cumplir ciertas condiciones. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, *The Organisation for Economic Cooperation and Development*) ha establecido principios clave para la validación de modelos QSAR (OECD, 2007), los cuales son ampliamente aceptados en el ámbito científico y regulatorio.

Uno de los primeros principios establece que la actividad o propiedad a ser modelada debe definirse claramente, ya que una misma propiedad puede medirse mediante distintos protocolos experimentales y bajo diferentes condiciones. Este principio asegura transparencia en el algoritmo utilizado para desarrollar el modelo, ya que la calidad del mismo no puede evaluarse de manera independiente sin información sobre el algoritmo.

El ámbito de aplicabilidad de un modelo QSAR está limitado a compuestos estructuralmente similares a los empleados en su calibración. Esto se debe a las limitaciones inherentes a los modelos QSAR, que dependen de los tipos de estructuras químicas consideradas, las propiedades fisicoquímicas y los mecanismos de acción que se pueden predecir de manera confiable. Por ello, cada modelo debe asociarse a un dominio de aplicabilidad que certifique su capacidad predictiva dentro de un rango de estructuras similares.

Es esencial evaluar la *robustez* del modelo, evitando el sobreajuste y asegurando su capacidad de predicción para moléculas no incluidas en el conjunto de entrenamiento. La validación de un modelo QSAR involucra tanto *validaciones internas* (bondad de ajuste y robustez) como *validaciones externas* (capacidad predictiva) mediante el uso de conjuntos de calibración y validación respectivamente.

Un aspecto crítico en el desarrollo de un modelo QSAR es la interpretación de los descriptores moleculares utilizados, que pueden ofrecer una visión mecanística de la relación entre la estructura molecular y la actividad o propiedad predicha. Aunque no siempre es posible obtener una interpretación mecanística, esto no necesariamente invalida la utilidad de un modelo dentro de un contexto regulatorio.

7.1.8. Descriptores moleculares

Los descriptores moleculares son uno de los pilares fundamentales en la teoría QSAR/QSPR. Estos constituyen las variables independientes en los modelos y permiten

predecir la actividad o propiedad de interés. De este modo, es crucial que la estructura molecular de los compuestos esté representada de manera adecuada para obtener modelos predictivos de calidad. La capacidad de plasmar la información codificada en una estructura química y transformarla en valores numéricos es esencial para establecer relaciones cuantitativas con las propiedades o actividades de las moléculas (Gasteiger & Engel, 2006).

El desarrollo histórico de los descriptores moleculares está estrechamente ligado al concepto de estructura molecular, reflejando la creatividad de los autores para representar químicamente una molécula y extraer información útil de dicha representación. Existen múltiples formas de representar una molécula, y, por lo tanto, el conjunto de descriptores moleculares no es único. En general, se pueden dividir en dos grandes clases: *descriptores moleculares experimentales* y *teóricos*. Los primeros se obtienen mediante experimentos estandarizados, mientras que los teóricos se generan mediante algoritmos matemáticos aplicados a la representación de una estructura molecular (Todeschini & Consonni, 2009).

El campo de los descriptores moleculares es interdisciplinario, involucrando diversas teorías y disciplinas. Su aplicación abarca desde áreas clásicas como la Físico-Química y la Química Medicinal, hasta áreas más recientes como el estudio de nanomateriales, polímeros, péptidos y líquidos iónicos (Mauri *et al.*, 2016). El concepto de descriptor molecular está asociado a una representación matemática derivada de una especie química, ya sea mediante un algoritmo específico o un procedimiento experimental (Consonni & Todeschini, 2010; Mauri *et al.*, 2016).

En el año 2000, Todeschini & Consonni propusieron la siguiente definición: “El descriptor molecular es el resultado final de un procedimiento lógico y matemático que transforma la información química codificada en una representación simbólica de una molécula en un número útil o el resultado de algún experimento estandarizado” (Todeschini & Consonni, 2009). Considerando esta definición, queda claro que el campo de los descriptores moleculares es multidisciplinario y abarca teorías de distintos niveles. Dado que este campo es tan amplio y variado, continuamente se desarrollan nuevos descriptores, lo que requiere conocimientos en Álgebra, Teoría de Grafos, Teoría de la Información, Química Computacional, y Físico-Química, entre otros.

Para que un descriptor molecular sea aceptado, debe cumplir con ciertas reglas básicas (Randic, 1996; Guha & Willighagen, 2012):

- Ser invariante al etiquetado y enumeración de los átomos.
- Ser invariante a la rotación y traslación de la molécula.
- Estar definido por un algoritmo inequívoco.
- Tener aplicabilidad bien definida a estructuras moleculares específicas.

Estas reglas ayudan a determinar si un descriptor molecular está bien definido, aunque no necesariamente aseguran que sea adecuado para predecir una actividad o propiedad específica. Para que un descriptor sea útil en un modelo QSAR/QSPR, debe proporcionar una interpretación adecuada de la estructura de los compuestos, ser independiente de otros descriptores, y poder captar variaciones mínimas en la estructura molecular. Además, debe ser capaz de discriminar entre isómeros y ser aplicable a una amplia gama de moléculas.

7.1.9. La estructura molecular

Al igual que en cualquier ámbito, para transmitir una idea de manera efectiva en Química es necesario utilizar un lenguaje común. Sin embargo, en esta disciplina se presenta un desafío adicional: la representación de las moléculas.

Con el avance de las tecnologías y los métodos de determinación estructural, se ha obtenido una creciente cantidad de información sobre el arreglo espacial de los átomos, así como sobre los tipos, ángulos y distancias de los enlaces. Este progreso permitió superar la representación bidimensional de los compuestos, donde sólo se indicaba qué átomos estaban conectados y por qué tipo de enlace (topología), y avanzar hacia una descripción tridimensional más precisa (topografía). Esta nueva representación hizo posible diferenciar compuestos que, bajo la descripción más simple, parecían ser idénticos, como en el caso de los isómeros, y brindó mayor información sobre los mecanismos de acción de reacciones químicas, basada en los potenciales electrostáticos y densidades electrónicas presentes en las moléculas.

La correcta representación de la estructura molecular es crucial en la teoría QSAR, ya que de ella depende el valor de las propiedades a predecir. Según el tipo de representación molecular utilizada, se obtiene distinta información reflejada en los descriptores moleculares calculados (Testa & Kier, 1991).

La forma más simple de representar la estructura de una molécula es mediante su fórmula química, que sólo indica el número y tipo de átomos presentes. Sin embargo, esta representación ofrece información muy limitada, ya que no especifica la conectividad atómica ni la conformación de la molécula. Por ello, los descriptores moleculares calculados a partir de esta representación se denominan *descriptores de tipo 0D* o *constitucionales*, e incluyen información básica como el número de átomos de carbono o de nitrógeno en una molécula.

Cuando la fórmula química se detalla más, proporcionando información sobre los fragmentos estructurales dentro de la molécula, los descriptores moleculares obtenidos se denominan *descriptores 1D*. Estos se utilizan comúnmente en el análisis de similitud/diversidad o en el cribado virtual de grandes bases de datos, ya que los fragmentos no representan la topología completa de la estructura química y, por lo tanto, pueden ser calculados e interpretados fácilmente.

Una de las formas más comunes y muy utilizadas para representar una estructura molecular es la *representación topológica*, que es bidimensional y se basa en grafos moleculares. Los descriptores moleculares calculados a partir de la representación topológica se denominan *descriptores 2D*.

Con el objetivo de proporcionar una descripción más detallada de la estructura molecular, se utiliza una representación geométrica tridimensional que refleja la disposición de los átomos en el espacio. Los descriptores moleculares calculados con esta representación se conocen como *descriptores 3D*. Debido a que los compuestos químicos existen en diversas conformaciones que minimizan su energía, los valores de los descriptores 3D pueden variar según la conformación utilizada para su cálculo (García *et al.*, 2016).

7.1.10. Antecedentes y estado del arte

Hace algún tiempo nuestro grupo de investigación compiló los estudios 2D- y 3D-QSAR de flavonoides, biflavonas y chalconas (Mercader & Pomilio, 2012a) analizando su actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica y antimicobacteriana. Las principales conclusiones mostraron que los flavonoides, biflavonoides y chalconas presentan numerosas propiedades beneficiosas para la salud humana con un potencial muy alto como productos medicinales. Ya que, si bien su potencia no es excepcionalmente alta, se sabe que son naturales e inoocuos. Además, han demostrado ser muy favorables potenciadores de tratamientos; por ejemplo, han mostrado resultados prometedores en un tratamiento combinado con TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand*; ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) y otros agentes actuales de quimioterapia (Mercader & Pomilio, 2012b).

Por otro lado, resultó evidente que el número y la calidad de los estudios de análisis estructural dependen del número de datos experimentales disponibles de la actividad en cuestión; como ejemplo, existen numerosos estudios estructurales de los inhibidores de la integrasa anti-VIH-1. Por el contrario, todavía no se han realizado estudios predictivos QSAR sobre la familia de los biflavonoides únicamente; en dichos estudios, los biflavonoides participan sólo como parte del conjunto de datos. Esto también fue evidente en un estudio QSAR de flavonoides y biflavonoides como inhibidores de la neuraminidasa del virus H1N1, donde quedó claro que se necesitaban más mediciones de biflavonoides para llegar a predicciones más confiables (Mercader & Pomilio, 2010).

Al revisar los estudios de actividad cuantitativa de los últimos años, se puede ver que el panorama no ha cambiado, ya que, si bien el número de estudios experimentales ha aumentado, los datos disponibles para cada uno de ellos son, en su mayoría, escasos.

Se han investigado modelos QSAR que permiten predecir el potencial uso de los flavonoides como fármacos, sin necesidad de efectuar trabajos experimentales. Esta metodología es utilizada por las grandes empresas farmacéuticas y alimentarias.

La principal bioactividad analizada ha sido la citotoxicidad (Ohno *et al.*, 2013), en especial en la línea celular de células madre de cáncer de mama humano MCF7-SC (Jung *et al.*, 2015), y la actividad anticarcinogénica, en particular para la línea celular cancerosa HepG2, que se usa para estudiar el carcinoma hepatocelular y la función hepática (Qian *et al.*, 2015). Asimismo, se estudiaron los modelos QSAR de la actividad inhibitoria *in vivo* ante la proteína de resistencia del cáncer de mama, BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) que, como transportadora, hace que las células cancerosas se vuelvan resistentes a los medicamentos contra el cáncer (Qian *et al.*, 2014; Sachan *et al.*, 2014). Los flavonoides como bloqueantes de BCRP son prometedores en la terapia anti-cáncer.

Los estudios QSAR de flavonoides abarcan también la inhibición de algunas enzimas de interés clínico, como:

- *Inhibición de acetilcolinesterasa*: Se encuentra en el sistema nervioso central, las terminales nerviosas y los glóbulos rojos. Los inhibidores de acetilcolinesterasa se usan para tratar la miastenia grave y la enfermedad de

Alzheimer, entre otras (Goyal *et al.*, 2014; Gunda *et al.*, 2015a; Smida *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015). Se demostró que las propiedades estéricas, electrostáticas, hidrofóbicas, donantes yceptoras de puentes de hidrógeno tienen un rol importantísimo en la enfermedad de Alzheimer (Gunda *et al.*, 2015a).

- *Inhibición de la enzima aromatasas*: Actúa en el metabolismo de las hormonas sexuales, y tiene acción contra el cáncer de mama dependiente de estrógeno (Awasthi *et al.*, 2015).
- *Inhibición de la enzima proteína tirosín-quinasa P56lck*: Es específica de leucocitos, y se encuentra en los linfocitos que son células especializadas del sistema inmunitario. Lck fosforila a unidades de tirosina de ciertas proteínas que participan en las vías de señalización intracelular de estos linfocitos. P56lck interviene en la regulación de la homeostasis del sistema inmunitario. Las mutaciones de P56lck están asociadas a enfermedades como la inmunodeficiencia combinada severa, y la sobreexpresión de P56lck está ligada a: cáncer, asma, diabetes tipo 1 y artritis reumatoide. Los flavonoides son inhibidores de P56lck como se demostró por estudios QSAR utilizando campos estéricos, electrostáticos, donantes y aceptores de puentes de hidrógeno (Gunda *et al.*, 2014).
- *Inhibición de la enzima aldosa-reductasa*: Cataliza la conversión de glucosa en sorbitol. Estos inhibidores son importantes en el tratamiento de la neuropatía diabética, que es una complicación común en la diabetes (Ray & Manna, 2013; Vyas *et al.*, 2015).
- *Inhibición de la enzima telomerasa*: Ayuda a las células a mantenerse vivas al alargar los telómeros (estructuras que se encuentran en los extremos de los cromosomas). Es un marcador hormonal, pues aumenta en la mayoría de los cánceres humanos. La telomerasa tiene implicancias en oncología, gerontología y medicina regenerativa. Los flavonoides la inhiben según estudios QSAR (Manivannan & Moorthy, 2013).
- *Inhibición de la enzima aldehído-oxidasa*: Interviene en la metabolización de los fármacos (farmacocinética). Su inhibición disminuye las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) como H₂O₂. De esta manera, los flavonoides son moduladores en procesos de enfermedad (Hamzeh-Mivehroud *et al.*, 2014). Por QSAR se vio que el tamaño de los flavonoides es relevante para la actividad.

Además, los flavonoides mostraron:

- *Interacción con la enzima lisozima*: Se encuentra en saliva, lágrimas, leche materna, plasma sanguíneo, bazo y pulmones. Posee propiedades bactericidas y antivirósicas (antiherpes, como el herpes zoster, herpes simple, varicela, sarampión, gripe, entre otras enfermedades virósicas) (Yang *et al.*, 2012).
- *Inhibición del receptor del factor activador de plaquetas (PAF, Platelet Activating Factor)*: Participa en varias condiciones fisiopatológicas como la

inflamación, la aterosclerosis, el asma y la trombosis. PAF es un fosfolípido que provoca agregación plaquetaria y disminuye la permeabilidad vascular (Abdullah *et al.*, 2014).

- *Actividad contra Escherichia coli*: Se mostró que la actividad de los flavonoides puede estar relacionada con la hidrofobicidad molecular (CLogP) y las cargas en C-3 (Wu *et al.*, 2013).
- *Actividad antioxidante*: Se han desarrollado diversos modelos QSAR referidos a esta actividad (Das *et al.*, 2014; Djeradi *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014) estudiando diferentes radicales, y utilizando desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN (δ_c) y la entalpía mínima de disociación de enlace ($\text{BDE}_{\text{m n}}$, *Minimal O-H Bond Dissociation Enthalpy*) (Lučić *et al.*, 2014). Se llegó a la conclusión que el valor mínimo de δ_c está relacionado con las subestructuras 3',4'-dihidroxilo en el anillo B y el grupo 3-OH fenólico en el anillo C, es decir los sitios preferidos del ataque radical. Los δ_c de los carbonos que portan grupos OH fenólicos están de acuerdo con los BDEs de O-H, es decir, describen la capacidad de donación de átomos de H de los grupos OH fenólicos (Lučić *et al.*, 2014).

Estos resultados QSAR muestran la potencial utilización clínica de los flavonoides contra varias enfermedades, respetando los parámetros y limitaciones propias de cada modelo como el dominio de aplicabilidad y las propiedades o interacciones intervinientes.

7.1.11. Estudios QSAR en antocianinas

El estudio de las antocianinas y antocianidinas ha demostrado su potencial biológico en diversas actividades, entre las que se destacan sus efectos antioxidantes, antimutagénicos y anticarcinogénicos. Sin embargo, la inestabilidad de estos compuestos y las dificultades en su aislamiento representan limitaciones importantes en la recolección de datos experimentales detallados. En este contexto, los modelos QSAR ofrecen una alternativa invaluable. Estos modelos permiten establecer correlaciones matemáticas entre la estructura molecular y la actividad biológica, facilitando la predicción de propiedades en un amplio rango de compuestos sin necesidad de su obtención experimental. Esta capacidad predictiva de los estudios QSAR es particularmente relevante en la investigación de moléculas complejas como las antocianinas, donde la recolección de datos experimentales es un proceso arduo y costoso. Así, los modelos QSAR no sólo optimizan recursos, sino que permiten profundizar en el conocimiento de la actividad biológica de estos compuestos con un enfoque eficiente y sistemático.

Si bien el empleo de modelos QSAR en el estudio de antocianinas y antocianidinas es aún incipiente, su potencial para revelar aspectos de su actividad biológica, como la actividad antioxidante (Jing *et al.*, 2014), y contribuir al diseño de nuevos compuestos bioactivos subraya su importancia en este campo de investigación. La aplicabilidad de estos modelos en el ámbito farmacéutico, por ejemplo, ha impulsado el desarrollo de compuestos con propiedades mejoradas y abre la posibilidad de optimizar sus efectos mediante modificaciones estructurales específicas.

Dado el intrincado espacio conformacional de las antocianinas, caracterizado por múltiples conformeros coexistentes (estudiado en los Capítulos 5 y 6 de esta Tesis), en estos estudios se optó por emplear descriptores independientes de la conformación. Al restringir el análisis a aspectos estructurales sin considerar las variaciones conformacionales, el modelo QSAR refleja con precisión propiedades fundamentales, garantizando su aplicabilidad en compuestos con flexibilidad estructural significativa y manteniendo una eficiencia computacional elevada. Esta elección permite, además, evitar la ambigüedad que podría introducirse al intentar representar todas las conformaciones posibles de cada molécula en el espacio conformacional.

La complejidad adicional en el desarrollo de estos modelos proviene del reducido tamaño del conjunto molecular disponible, situación que obliga a adoptar procedimientos de mayor rigurosidad en la generación, calibración y validación de los modelos QSAR. Para determinar el número adecuado de descriptores en la relación estructura-actividad, se consideró el razonamiento de Occam, siguiendo también las reglas prácticas que recomiendan incluir aproximadamente un descriptor por cada 6 o 7 datos en el conjunto de calibración (N_{cal}). Asimismo, al separar el conjunto en subconjuntos de calibración y validación, se intenta mantener un mínimo de 18 moléculas en el conjunto de calibración, lo cual permite generar modelos de hasta tres descriptores. Este proceso asegura que los modelos desarrollados no sólo sean ajustados a los datos disponibles, sino que también mantengan la capacidad de abarcar nuevas estructuras, incrementando su validez en el análisis predictivo.

La metodología aplicada incluye una serie de pasos sistemáticos que comprenden la organización y preprocesamiento de los datos, la selección rigurosa de descriptores y la validación estadística de los modelos mediante técnicas de validación cruzada y validación externa. La combinación de estas técnicas garantiza la precisión y aplicabilidad del modelo en compuestos estructuralmente complejos como las antocianinas. Así, los estudios abordados en esta Tesis no sólo avanzan en el desarrollo de herramientas predictivas para evaluar la actividad biológica de las antocianinas y antocianidinas, sino que también contribuyen al campo de la Química Computacional y al diseño racional de nuevos compuestos bioactivos.

7.2. Análisis QSAR de la actividad antioxidante y captación de radicales libres de antocianinas

Los organismos vivos mantienen un sistema redox que asegura el equilibrio adecuado para una homeostasis saludable, esencial para la sostenibilidad de la vida. Los antioxidantes son compuestos que actúan en la reducción, inhibición o prevención de la oxidación de materiales oxidables, lo que contribuye a disminuir el estrés oxidativo. Estos compuestos pueden intervenir en distintas etapas de la cadena de reacciones de radicales libres, incluyendo la iniciación, propagación, terminación, descomposición y la oxidación subsecuente de los productos (Suja *et al.*, 2004; Carochó & Ferreira, 2013). En contraste, los

pro-oxidantes son especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*), presentes en sistemas biológicos y con diversas fuentes de origen (Carocho & Ferreira, 2013), las cuales se encuentran tanto en alimentos como en los sistemas biológicos.

Algunos ROS, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Wang & Jiao, 2000), y RNS son potentes reguladores de la replicación celular y desempeñan roles cruciales en la transducción de señales (Khan & Wilson, 1995). Estos procesos de señalización celular (Dröge, 2002; Miguel, 2011) ocurren constantemente durante el metabolismo normal, aunque también pueden provenir del metabolismo de toxinas ambientales o carcinógenas, de la radiación ionizante, o de la actividad de células fagocíticas involucradas en la respuesta inflamatoria.

En los alimentos, la auto-oxidación y la generación de rancidez son causadas por la peroxidación lipídica, mientras que, en los sistemas vivos, los radicales libres atacan a moléculas biológicas clave, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades degenerativas. Sin embargo, los radicales libres, y en particular el peróxido de hidrógeno, resultan esenciales para la vida celular y de los organismos (Nagy, 2001; Dröge, 2002).

Cuando el equilibrio redox se pierde, se genera estrés oxidativo, una condición caracterizada por un exceso de ROS/RNS que supera la capacidad antioxidante endógena, resultando en la oxidación de proteínas, enzimas, ADN y lípidos (**Figura 7.2**). El estrés oxidativo desempeña un papel significativo en el desarrollo de enfermedades degenerativas crónicas (Dai & Mumper, 2010).

Las antocianinas, en particular, presentan un potencial quimiopreventivo considerable debido a sus propiedades antioxidantes (Kampa *et al.*, 2007), ya que pueden inhibir el daño oxidativo celular inducido por carcinógenos y toxinas. Por ejemplo, las antocianinas presentes en las bayas y el vino han demostrado reducir el estrés oxidativo asociado con el envejecimiento y mejorar las funciones neuronales y cognitivas (Bagchi *et al.*, 2004). En general, las antocianinas protegen la integridad del ADN y elevan los niveles antioxidantes en los tejidos.

Las propiedades antioxidantes de las antocianinas (Bowen-Forbes *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015) se deben a: 1) Su capacidad para neutralizar ROS, en particular el peróxido de hidrógeno (Wang & Jiao, 2000). 2) Su habilidad para descomponer peróxidos y formar productos no radicalarios, como alcoholes. 3) La inhibición de la formación de ROS/RNS mediante la supresión de ciertas enzimas y la quelación de metales traza que participan en la generación de radicales libres (Cotelle, 2001; Kong *et al.*, 2003; Dai & Mumper, 2010; Miguel, 2011), lo cual ayuda a prevenir la aparición de tumores (Shih *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que, debido a su alta reactividad, los radicales libres son extremadamente inestables y tienen un tiempo de vida breve. Su presencia en los organismos vivos es posible gracias a su compartimentalización a nivel celular (Thankam Finosh & Jayabalan, 2013). Así, el H_2O_2 se produce como el principal subproducto del metabolismo celular, favorecido termodinámicamente debido a su potencial redox positivo. Las antocianinas intervienen eliminando el H_2O_2 de las células, mayormente a través de la

reacción de Fenton, lo cual concuerda con el mecanismo propuesto para esta reacción (Vitale *et al.*, 2016).

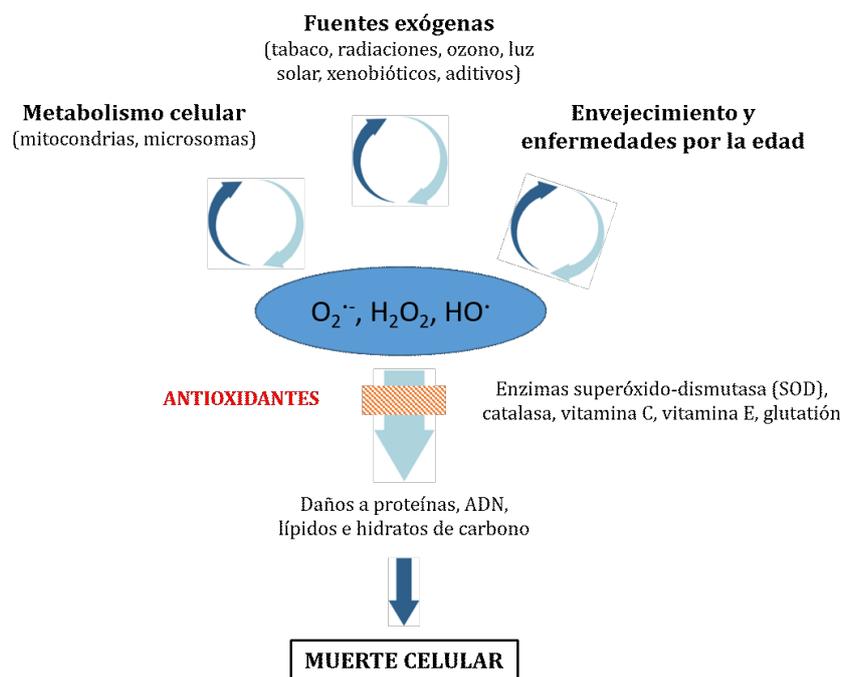


Figura 7.2. Estrés oxidativo y acción de antioxidantes endógenos y exógenos.

Numerosos estudios han comprobado los efectos antioxidantes de las antocianinas en diferentes líneas celulares, como células de colon (Parry *et al.*, 2006; Renis *et al.*, 2007), endoteliales (Bagchi *et al.*, 2004), hepáticas (Meyers *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2007), de mama (Olsson *et al.*, 2004; Singletary *et al.*, 2007), leucémicas (Feng *et al.*, 2007) y queratinocitos (Afaq *et al.*, 2007). En estos estudios, las antocianinas han mostrado efectos antitóxicos y anticancerígenos, tales como: captura de ROS, inducción de la expresión de enzimas detoxificantes de fase II, reducción de aductos oxidativos en el ADN, disminución de la peroxidación lipídica, inhibición de la mutagénesis por toxinas ambientales y carcinógenos, y reducción de la proliferación celular mediante la modulación de las vías de señalización celular (Wang & Stoner, 2008; Lin *et al.*, 2017).

Un ejemplo relevante es la capacidad de las antocianinas para inducir enzimas detoxificantes y antioxidantes de fase II en células en cultivo (Shih *et al.*, 2005), incluidas aquellas asociadas al glutatión, como glutatión-reductasa, glutatión-peroxidasa y glutatión-S-transferasa. El mecanismo de acción de las antocianinas en estos efectos incluye la activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Response Element*). El efecto promotor de las antocianinas sobre la expresión de enzimas de fase II reguladas por ARE es fundamental para la defensa celular contra el estrés oxidativo (Shih *et al.*, 2007; Thoppil *et al.*, 2012).

En conclusión, las propiedades antioxidantes de las antocianinas les permiten proteger a las células humanas de mutaciones malignas en presencia de altos niveles de ROS, previniendo mutaciones puntuales y ejerciendo así su efecto antimutagénico. Cabe destacar que esta actividad depende en gran medida de su estructura química, aspecto que se analiza en el presente estudio.

7.2.1. Actividad antioxidante y capacidad de captación de radicales libres de antocianinas

Se seleccionaron 17 antocianinas y 6 antocianidinas para las que se disponía de datos experimentales de ensayos antioxidantes (Kähkönen & Heinonen, 2003). Las estructuras químicas de las antocianinas seleccionadas, de notable complejidad, incluyeron: (a) *antocianidinas* (no glicosiladas) como: pelargonidina (**1**), cianidina (**2**), delphinidina (**3**), peonidina (**4**), petunidina (**5**) y malvidina (**6**); (b) *antocianinas: 3-O-monoglicósidos de antocianidinas*, con monosacáridos (glucosa, galactosa y arabinosa) en la posición 3 de la aglicona, como: pelargonidina-3-O-glucósido (**7**), cianidina-3-O-glucósido (**8**), delphinidina-3-O-glucósido (**9**), peonidina-3-O-glucósido (**10**), petunidina-3-O-glucósido (**11**), malvidina-3-O-glucósido (**12**); cianidina-3-O-galactósido (**13**), peonidina-3-O-galactósido (**14**), malvidina-3-O-galactósido (**15**); cianidina-3-O-arabinósido (**16**), peonidina-3-O-arabinósido (**17**); (c) *antocianinas: 3-O-diglicósidos de antocianidinas*, con disacárido (rutinosa = disacárido 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosil) en la posición 3 de la aglicona, como: cianidina-3-O-rutinósido (**18**) y delphinidina-3-O-rutinósido (**19**); (d) *antocianinas: 3,5-O-diglicósidos de antocianidinas*, con monosacáridos (glucosa) en las posiciones 3 y 5 de la aglicona, como: cianidina-3,5-di-O-glucósido (**20**) y malvidina-3,5-di-O-glucósido (**21**); (e) una *antocianina: 3-O-diglicósido-5-O-monoglicósido de antocianidina*, con disacárido (xilosilglucósido = sambubiosa = disacárido 2-O- β -D-xilopiranosil- β -D-glucopiranosil) en la posición 3 y monosacárido (galactosa) en la posición 5 de la antocianidina, como: cianidina-3-O-sambubiósido-5-O-galactósido (**22**); y (f) una *antocianina monoacilada: 3-O-monoacildiglicósido-5-O-monoglicósido de antocianidina*, con disacárido monoacilado (cumaróil-xilosilglucósido = (*E*)-*p*-cumaróilsambubiósido = 6''-O-(*E*)-*p*-cumaróilsambubiósido) en la posición 3 y monosacárido (galactosa) en la posición 5 de la antocianidina, donde el grupo acilo corresponde a un derivado del ácido cinámico, *p*-cumaróilo, como: cianidina-3-O-(6''-O-(*E*)-*p*-cumaróil)sambubiósido-5-O-galactósido (**23**). Para fines comparativos se incluyeron antioxidantes bien conocidos, como el ácido ascórbico, α -tocoferol y Trolox; tres ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido cafeico y ácido clorogénico; y tres flavonoides: quercetina, rutina y catequina (Bentz *et al.*, 2017).

La actividad antioxidante de las antocianidinas y sus derivados glicosilados fue evaluada en tres medios lipídicos distintos: aceite emulsionado y en fase a granel (linoleato de metilo, MeLo) mediante ensayos *in vitro* y en LDL de origen humano, conocidas como colesterol malo, en un ensayo *ex vivo*. Las concentraciones aplicadas fueron de 250 μ M, 25 μ M y 50 μ M para cada inhibidor en los respectivos medios. Asimismo, se estudió la capacidad de captación de radicales libres de estos compuestos frente al radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH \bullet).

7.2.2. Desarrollo de los modelos QSAR para la actividad antioxidante

Se desarrollaron Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR) con el objetivo de predecir el porcentaje de inhibición de la formación de productos de oxidación (% I) cuando los inhibidores se añadieron a diferentes concentraciones. Para representar las estructuras de las antocianinas, se utilizaron descriptores moleculares independientes

de la conformación, reflejando su naturaleza constitucional y topológica. La principal ventaja de prescindir de las conformaciones moleculares es que la única información experimental necesaria para construir los modelos QSAR es la actividad biológica de interés, en este caso la actividad antioxidante (Duchowicz *et al.*, 2012, 2014; Ortiz *et al.*, 2017; Aranda *et al.*, 2017; Duchowicz, 2018). Así, no se requiere información experimental adicional a nivel microscópico, como la obtenida de datos cristalográficos por rayos-X, los cuales muchas veces son desconocidos. Esto permite establecer un modelo QSAR basado en la mínima información experimental imprescindible (actividad biológica experimental, % I), lo que hace que los estudios QSAR independientes de la conformación sean sumamente útiles para una amplia variedad de sistemas químicos.

Las estructuras moleculares de las 17 antocianinas y 6 antocianidinas fueron generadas en formato MDL (*Method Detection Limit*) .mol (V2000) utilizando el software gratuito ACD/ChemSketch (2019). Posteriormente, se calcularon 46.994 descriptores linealmente independientes mediante herramientas de acceso libre.

El programa *Pharmaceutical Data Exploration Laboratory* (PaDEL) versión 2.20 (2019) permitió calcular descriptores moleculares tipo 0D-2D, junto a diversas huellas dactilares o *fingerprints* (representación abstracta de las características estructurales de una molécula).

Por otro lado, mediante el software *Molecular Descriptors from 2D Structures* (Mold²) (Hong *et al.*, 2008) se obtuvieron descriptores moleculares 1D-2D de fácil interpretación, mientras que descriptores más complejos fueron obtenidos utilizando el software *Quadratic, Bilinear and N-Linear MapS* (QuBiLS-MAS) (Valdes-Martini *et al.*, 2012) mediante el módulo *Graph-Theoretic Electronic Density Matrices and Atomic Weightings* (MAS) de la plataforma gratuita ToMoCoMD-CARDD, los cuales reflejan exclusivamente las características constitucionales y topológicas de las moléculas estudiadas.

Mediante el programa *Estimation Programs Interface* (EPI) Suite (2018), se obtuvieron estimaciones de propiedades físicas, químicas y de carácter ambiental, codificadas en descriptores moleculares.

Por último, se calcularon descriptores basados en la densidad de carga atómica que codifican información electrónica y estructural relevante para la química de las interacciones intermoleculares, mediante el software RECON (Lavine *et al.*, 2003).

Las moléculas en este estudio fueron divididas en un *conjunto de calibración* (cal) para la selección de descriptores y el ajuste de parámetros en la regresión lineal multivariable (MLR, *Multivariable Linear Regression*), y en un *conjunto de validación externa* (val) para evaluar la capacidad predictiva del modelo final. Para esta división se utilizó la técnica de Subconjuntos Balanceados (BSM, *Balanced Subsets Method*) (Rojas *et al.*, 2015). Además de la validación externa, cada modelo fue sometido a una validación teórica mediante la técnica de *validación cruzada* de "Dejar-Uno-Afuera" (LOO, *Leave One Out*) (Gramatica, 2007).

La selección de descriptores afecta directamente la precisión, complejidad y capacidad predictiva de los modelos QSAR/QSPR. La estrategia más sencilla empleada fue MLR, en la que se eligen unos pocos descriptores que mejor predicen la propiedad de interés. Dado que la selección de descriptores es un proceso complejo, se utilizó el Método del Reemplazo (RM, *Replacement Method*) (Duchowicz *et al.*, 2006 a), un algoritmo

matemático desarrollado por nuestro grupo de investigación, que selecciona los mejores descriptores minimizando la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE, *Root Mean Square Error*) del conjunto de calibración. Este enfoque permite obtener soluciones aproximadas que, en algunos casos, coinciden con las soluciones exactas (evaluación exhaustiva de todas las combinaciones de variables) y, en otros casos, son muy cercanas (Duchowicz *et al.*, 2006 a; Mercader *et al.*, 2010, 2011). Todos los algoritmos de Matlab utilizados fueron desarrollados por nuestro grupo y están disponibles bajo solicitud.

Finalmente, tras identificar la mejor solución, la capacidad del modelo se evaluó utilizando técnicas de validación cruzada y validación externa, así como el análisis del dominio de aplicabilidad, para confirmar que el modelo alcanzado sea aceptable y robusto.

7.2.3. Resultados y Discusión

La **Tabla 7.2** proporciona una descripción resumida de los descriptores moleculares más representativos seleccionados entre los 46.994 descriptores linealmente independientes disponibles. Estos descriptores son esenciales en las diferentes relaciones cuantitativas estructura-actividad antioxidante de las 23 antocianinas analizadas.

Tabla 7.2. Breve descripción de los descriptores de los modelos QSAR.

Tipo de descriptor	Símbolo	Descripción
<i>Klekota Roth</i>	<i>KR1653</i>	Presencia de fenol disustituido en posición 2,5
<i>QuBiLS-MAS</i>	<i>qub1, qub2, qub3, qub4, qub5, qub6, qub7, qub8</i>	Índices matemáticos obtenidos de formas algebraicas de tipo cuadrática, bilineal y lineal, basados en matrices de la teoría de Grafos y pesos atómicos
<i>Bader</i>	<i>SIKA8</i>	Descriptor topológico de la teoría de Bader
<i>Electrotopológico</i>	<i>minHBint4</i>	Mínimo descriptor de estado-E de fuerza para potenciales enlaces hidrógeno de trayecto de longitud 4
<i>Mold2</i>	<i>D197</i>	Índice electrotopológico
<i>Autocorrelación 2D</i>	<i>D458</i>	Autocorrelación de Geary de orden 4-pesado por volúmenes de van der Waals
	<i>GATS6p</i>	Autocorrelación de Geary de orden 6-pesado por polarizabilidades
<i>Matriz de Barysz</i>	<i>VR1.Dzm</i>	Índice basado en el autovector tipo Randic de la matriz de Barysz / pesado por la masa
	<i>VR2.Dzs</i>	Índice basado en el autovector tipo Randic normalizado de la matriz de Barysz / pesado por el estado-I

A continuación, se exponen las regresiones lineales de QSAR más relevantes, las cuales predicen el porcentaje de inhibición de formación de productos de oxidación (% I) cuando los inhibidores se incorporan a distintas concentraciones. Cada modelo mantiene una relación adecuada entre el número de moléculas y el número de descriptores ($N_{cal} / d \geq 6$), evitando así el sobreajuste de los datos.

- **DPPH• (17 μM):**

$$\text{Log}(\% I+100) = -3,26GATS6p - 0,096qub1 + 10,47$$

(Ec. 7.2)

$$N_{cal} = 18; R_{cal}^2 = 0,87; RMSE_{cal} = 0,04; o2 = 0; R_{ijm\acute{a}x}^2 = 0,82$$

$$N_{val} = 5; R_{val}^2 = 0,45; RMSE_{val} = 0,04; R_{loo}^2 = 0,81; RMSE_{loo} = 0,04$$

- **MeLo emulsionado (50 μM):**

$$\text{Log}(\% I+100) = 3,07 \times 10^{-4} VR1.Dzm - 0,027 VR2.Dzs - 0,26qub2 + 5,20$$

(Ec. 7.3)

$$N_{cal} = 18; R_{cal}^2 = 0,93; RMSE_{cal} = 0,11; o2 = 0; R_{ijm\acute{a}x}^2 = 0,69$$

$$N_{val} = 5; R_{val}^2 = 0,35; RMSE_{val} = 0,11; R_{loo}^2 = 0,90; RMSE_{loo} = 0,14$$

- **MeLo emulsionado (250 μM):**

$$\text{Log}(\% I+100) = 0,10KR1653 + 0,71qub3 - 0,27qub4 + 1,16$$

(Ec. 7.4)

$$N_{cal} = 18; R_{cal}^2 = 0,78; RMSE_{cal} = 0,05; o2,5 = 0; R_{ijm\acute{a}x}^2 = 0,53$$

$$N_{val} = 5; R_{val}^2 = 0,68; RMSE_{val} = 0,05; R_{loo}^2 = 0,71; RMSE_{loo} = 0,06$$

- **LDL humano (2,5 μM):**

$$\text{Log}(\% I+100) = -0,19qub5 + 9,44$$

(Ec. 7.5)

$$N_{cal} = 10; R_{cal}^2 = 0,88; RMSE_{cal} = 0,06; o2 = 0$$

$$N_{val} = 2; R_{val}^2 = 1,00; RMSE_{val} = 0,06; R_{loo}^2 = 0,81; RMSE_{loo} = 0,07$$

- **LDL humano (10 μM):**

$$\text{Log}(\% I+100) = 1,89qub6 - 1,89 \times 10^5 qub7 - 6,71 \times 10^{-2} qub8 + 13,84$$

(Ec. 7.6)

$$N_{cal} = 18; R_{cal}^2 = 0,83; RMSE_{cal} = 0,20; o2,5 = 0; R_{ijm\acute{a}x}^2 = 0,72$$

$$N_{val} = 5; R_{val}^2 = 0,76; RMSE_{val} = 0,24; R_{loo}^2 = 0,71; RMSE_{loo} = 0,26$$

- **LDL humano (25 μM):**

$$\text{Log}(\%I+100) = 0,15\text{minHBint4} - 5,18 \times 10^{-4}D197 + 6,92 \times 10^{-3}SIKA8 + 4,29$$

(Ec. 7.7)

$$N_{cal} = 18; R_{cal}^2 = 0,87; RMSE_{cal} = 0,13; o3 = 0; R_{ijm\acute{a}x}^2 = 0,85$$

$$N_{val} = 5; R_{val}^2 = 0,45; RMSE_{val} = 0,16; R_{loo}^2 = 0,78; RMSE_{loo} = 0,16$$

- **MeLo a granel (50 μM):**

$$\text{Log}(\%I+100) = 2,61D458 + 3,42$$

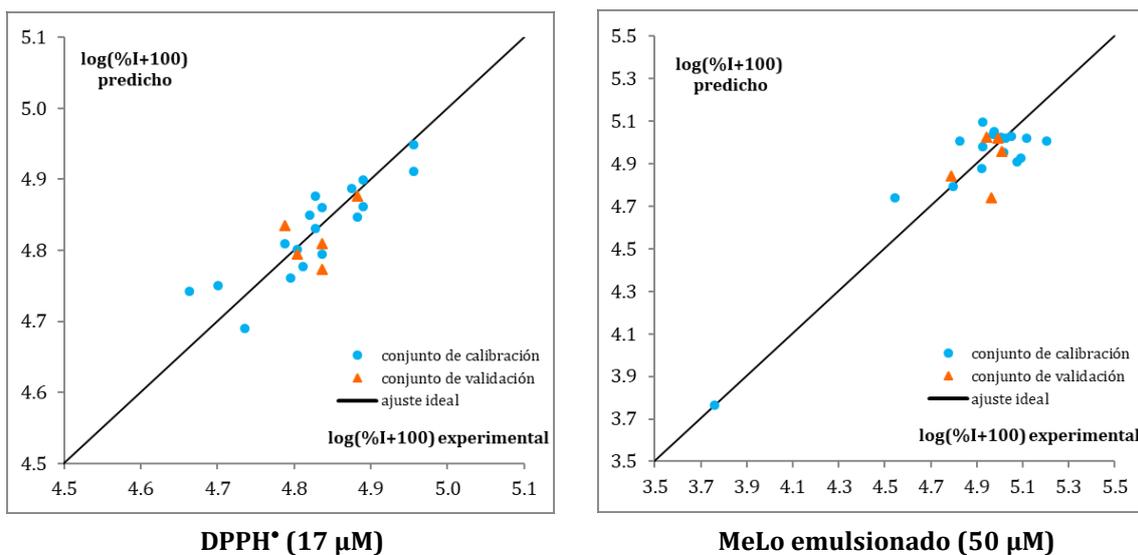
(Ec. 7.8)

$$N_{cal} = 9; R_{cal}^2 = 0,79; RMSE_{cal} = 0,13; o2 = 0$$

$$N_{val} = 2; R_{val}^2 = 1,00; RMSE_{val} = 0,09; R_{loo}^2 = 0,70; RMSE_{loo} = 0,15$$

En estas ecuaciones, R^2 representa el coeficiente de correlación lineal, N_{cal} indica el número de moléculas de calibración con un residuo superior a m . $RMSE_{cal}$, donde $RMSE_{cal}$ es la desviación estándar de calibración, y $R_{ijm\acute{a}x}^2$ señala la correlación máxima entre pares de descriptores.

Los descriptores moleculares en las **Ecuaciones (7.2 - 7.8)** predicen de manera confiable el potencial antioxidante. La **Figura 7.3** muestra una tendencia lineal al graficar la actividad antioxidante predicha frente a la actividad experimental, lo que respalda la precisión de cada modelo. La colinealidad máxima entre pares de descriptores ($R_{ijm\acute{a}x}^2$) no resulta significativa en las **Ecuaciones (7.2 - 7.8)**, lo que indica que cada descriptor incluido en la regresión lineal es necesario para la predicción de la bioactividad.



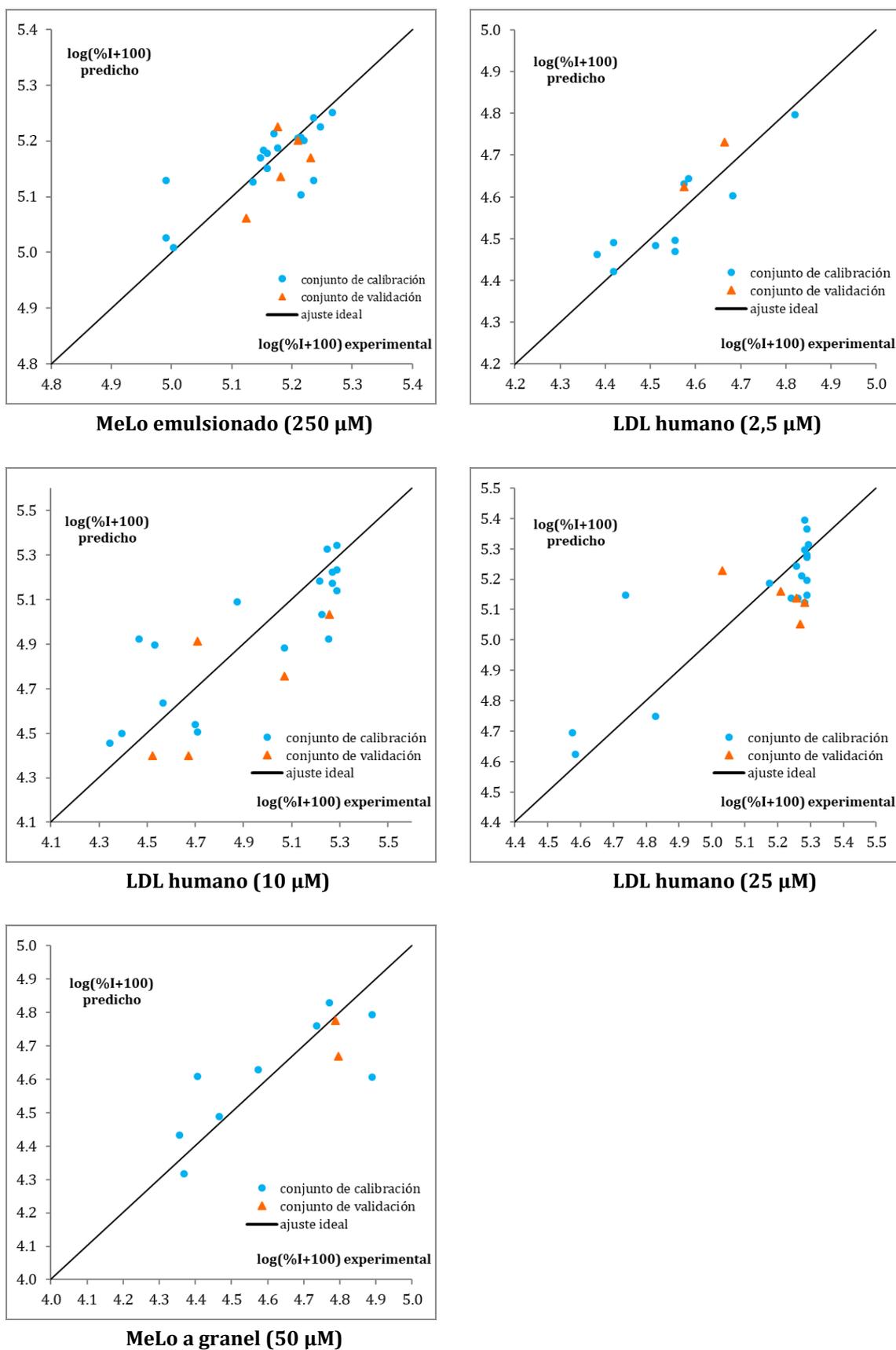
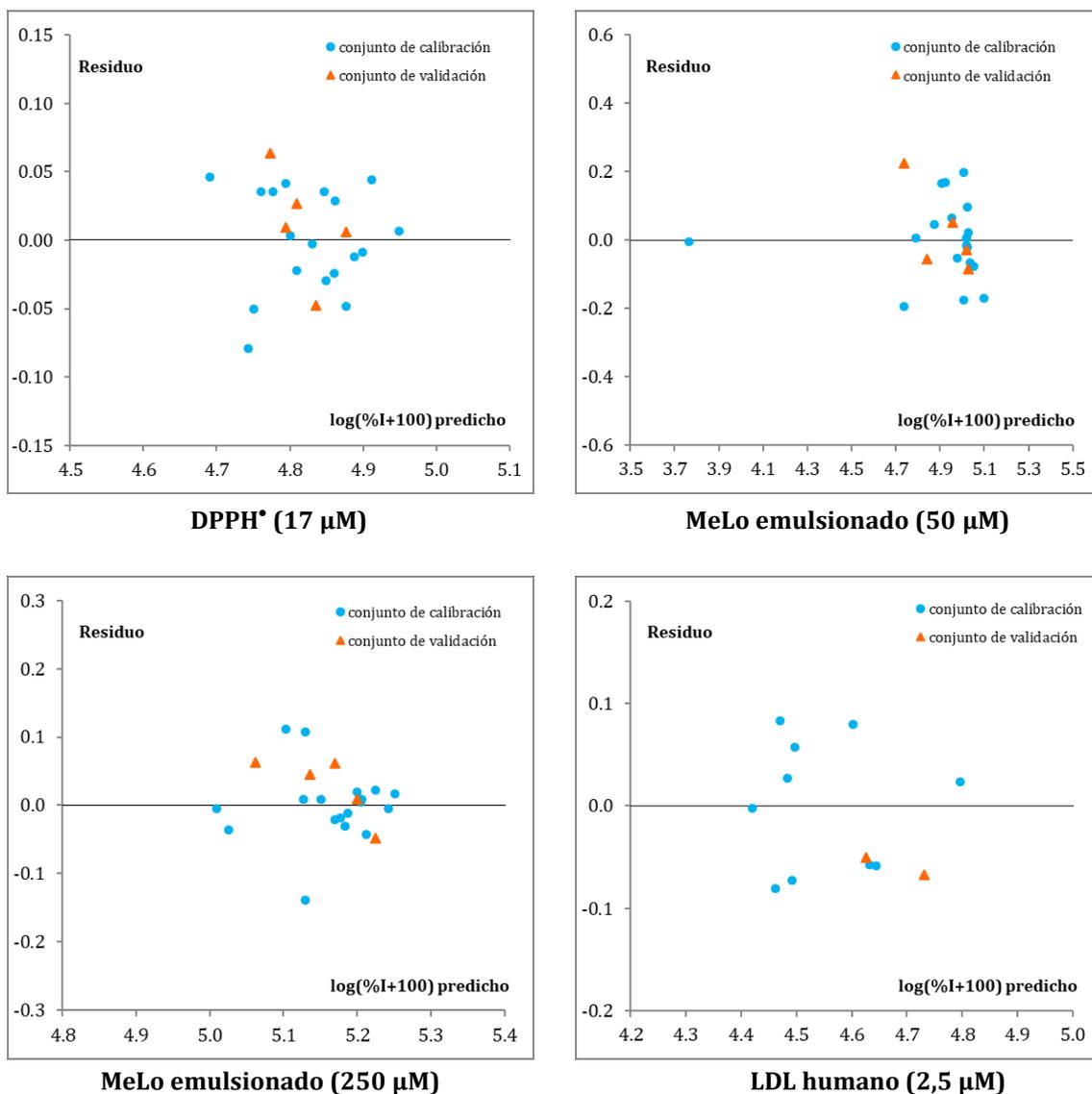


Figura 7.3. Predicciones de la actividad antioxidante según los modelos QSAR de las Ecuaciones (7.2 - 7.8).

La **Figura 7.4** presenta los gráficos de dispersión de residuos para los modelos QSAR, donde los datos se distribuyen de manera aleatoria alrededor de la línea de cero, lo cual sugiere la ausencia de errores sistemáticos en el modelado. Aunque el patrón mostrado en estos gráficos no permite una conclusión definitiva debido a la cantidad limitada de observaciones ($N = 23$), se decidió no eliminar ninguna estructura química con alto residuo, de modo que todas las moléculas del conjunto puedan ser analizadas y predichas. Además, ningún modelo presenta residuos superiores a 3 veces S_{cal} (0.3), lo que indica que no existen moléculas con comportamientos anómalos en las relaciones estructura-actividad.



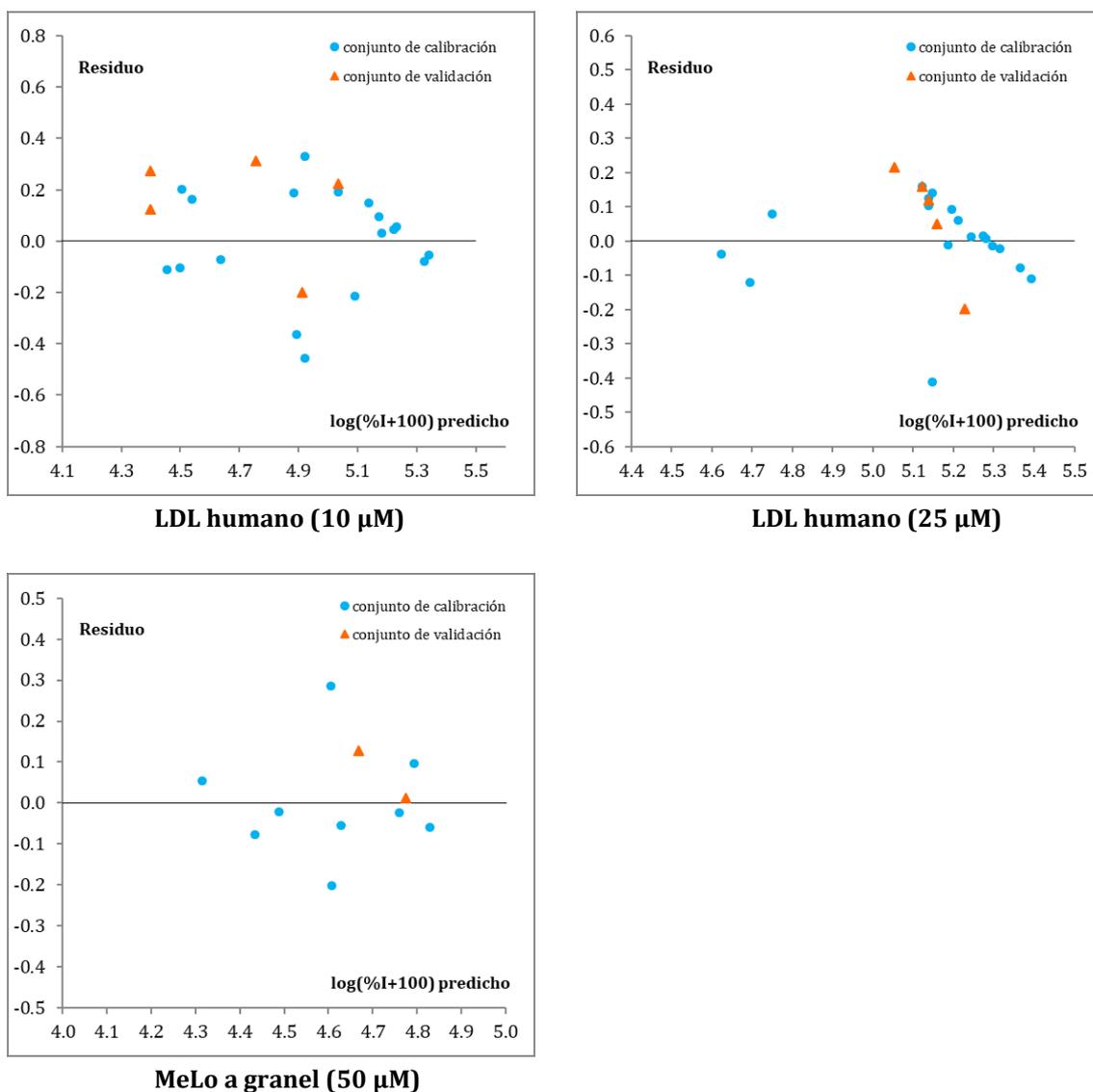


Figura 7.4. Gráficos de dispersión de residuos para los modelos propuestos.

La capacidad predictiva de estos modelos QSAR para la actividad antioxidante es adecuada, como lo indica el parámetro $RMSE_{val}$, el cual es comparable o menor que $RMSE_{cal}$ en las **Ecuaciones (7.2 - 7.8)**. Esto confirma que las antocianinas del conjunto de validación externa son correctamente predichas por los modelos basados únicamente en el conjunto de calibración. Cabe mencionar que el parámetro R_{val}^2 no es considerado relevante en este análisis debido al limitado número de moléculas de validación utilizadas ($N_{val} \leq 5$).

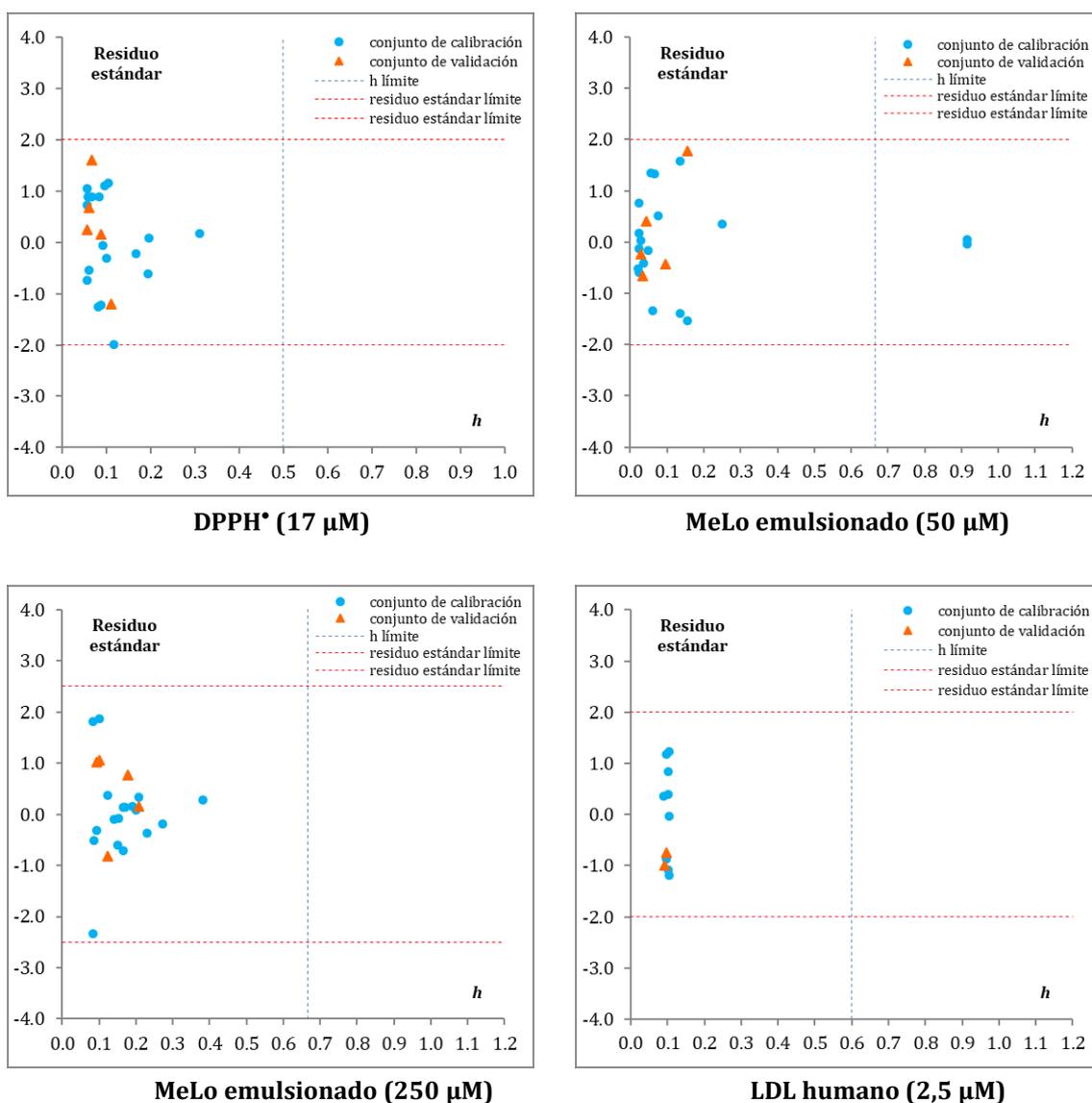
Además de contar con un conjunto de validación, cada modelo fue validado teóricamente mediante la técnica de validación cruzada 'Dejar-Uno-Afuera' (LOO). Los parámetros R_{loo}^2 y $RMSE_{loo}$ revelan que las **Ecuaciones (7.2 - 7.8)** son estables al remover cualquier molécula del conjunto de calibración y recalculer el modelo con las restantes, manteniendo los mismos descriptores.

Un modelo QSAR predictivo sólo puede realizar predicciones confiables para moléculas dentro de su dominio de aplicabilidad (AD), evitando así predicciones no confiables por extrapolación (Gramatica, 2007; Roy *et al.*, 2015). En este estudio, el AD se evalúa mediante el parámetro de influencia (h) (Eriksson *et al.*, 2003); la predicción de una

molécula de validación se considera confiable si su influencia es menor a la influencia límite (h^*). En la **Figura 7.5** se observa que las antocianinas de validación en las **Ecuaciones (7.2 - 7.8)** están dentro del AD de cada modelo, lo que asegura la fiabilidad de sus predicciones.

Los descriptores moleculares empleados en los modelos QSAR de este trabajo son independientes de la conformación, y reflejan únicamente aspectos constitucionales y topológicos. Aunque muchos de estos descriptores son abstractos y carecen de una interpretación física directa (**Tabla 7.2**), los modelos resultan útiles como guías QSAR para la síntesis de nuevas estructuras antioxidantes, siempre que las antocianinas en cuestión pertenezcan a los dominios de aplicabilidad de los modelos desarrollados.

Por ejemplo, en el modelo QSAR de la **Ecuación 7.2** para DPPH• (17 μM), los inhibidores cuyas estructuras presenten valores bajos en los descriptores *GATS6p* y *qub1* mostrarían mayor actividad antioxidante predicha. Esto se debe a que los descriptores en las **Ecuaciones (7.2 - 7.8)** tienen valores positivos, y la contribución de cada descriptor a la actividad predicha depende del signo y la magnitud de su coeficiente de regresión.



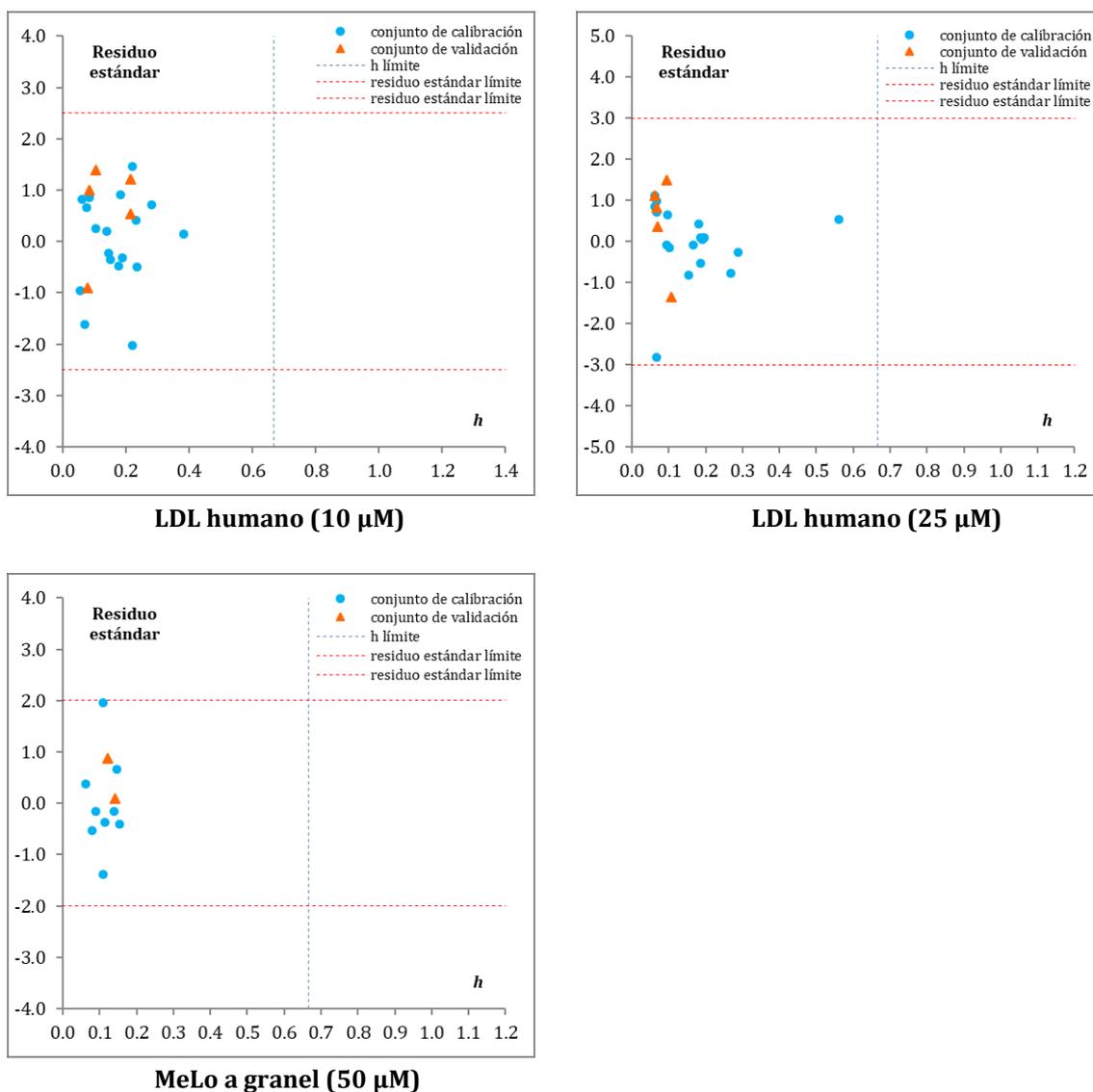


Figura 7.5. Residuos estandarizados en función del parámetro de influencia. Se indica la influencia límite.

7.2.4. Conclusiones de los modelos QSAR obtenidos para la actividad antioxidante

En el presente estudio se desarrollaron siete modelos basados en relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) para evaluar la capacidad antioxidante de diversas antocianinas en tres tipos de medios lipídicos: aceite emulsionado y en fase a granel (MeLo) y en lipoproteínas de baja densidad (LDL) de origen humano, a concentraciones de inhibidor de 250 μM , 25 μM y 50 μM . Además, se evaluó la capacidad de captación de radicales libres de estas moléculas frente al radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH*).

Los modelos QSAR generados, por primera vez, para los diferentes ensayos antioxidantes demostraron una capacidad predictiva adecuada, lo cual permite su uso para predecir la actividad antioxidante de antocianinas cuyo valor experimental no se haya

determinado. Estos modelos se fundamentan exclusivamente en descriptores constitucionales y topológicos de las estructuras moleculares, lo cual facilita su cálculo.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten: 1 establecer relaciones estructura-actividad satisfactorias para la predicción de propiedades antioxidantes mediante el uso de descriptores moleculares; 2 interpretar algunos de los fenómenos observados a nivel molecular; y 3 demostrar el potencial de los estudios QSAR para el diseño de nuevas moléculas con propiedades antioxidantes optimizadas. Sin embargo, resulta necesario proponer y desarrollar continuamente nuevas herramientas computacionales capaces de evaluar la capacidad antioxidante en un mayor número de conjuntos moleculares, dada la estrecha relación existente entre los procesos oxidativos y diversas enfermedades crónicas.

7.3. Análisis QSAR de la actividad antimutagénica por medio de la modulación del citocromo P₄₅₀^{3A4} (CYP3A4)

La familia de proteínas del citocromo P₄₅₀ (CYP) está ampliamente distribuida en todos los reinos de la vida, desde bacterias, arqueas y virus hasta plantas y animales superiores. Estas proteínas metabolizan una gran variedad de sustratos, tanto endógenos como exógenos, incluyendo compuestos producidos por el metabolismo celular y sustancias externas como aminas biogénicas (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013, agentes citostáticos (Evtsev *et al.*, 2006) y esteroides (Yamazaki *et al.*, 1998). Las CYP, que son monooxigenasas que contienen un grupo hemo, catalizan múltiples reacciones químicas como hidroxilación, epoxidación, oxidación, reducción, desaminación, deshalogenación, desalquilación, deshidrogenación y desmetoxigenación (Ortiz de Montellano & De Voss, 2005; Gillam & Hunter, 2007).

Entre las isoformas humanas, CYP3A4 es la más abundante y está presente principalmente en el hígado, donde metaboliza, total o parcialmente, entre el 45% y 60% de los fármacos clínicamente utilizados (Li *et al.*, 2018). Por ello, la regulación de su expresión y actividad resulta de gran relevancia clínica (Zanger & Schwab, 2013). Diversos flavonoides, incluidas las proantocianidinas (Lobayan *et al.*, 2009) y los biflavonoides (Mercader & Pomilio, 2011), presentes en frutas, verduras y suplementos dietarios, han mostrado la capacidad de modificar la actividad del sistema CYP (Miron *et al.*, 2017), alterando así la farmacodinamia y farmacocinética de numerosos fármacos comerciales (Moon *et al.*, 2006; Dreiseitel *et al.*, 2008).

Estudios previos han informado que antocianinas y sus derivados, como agliconas y procianidinas, presentan una inhibición de CYP dependiente de la concentración (Dreiseitel *et al.*, 2008). Asimismo, se ha sugerido que el número de fracciones de azúcar en estas moléculas reduce su efecto sobre CYP3A4, subrayando la necesidad de obtener datos más detallados sobre las relaciones estructura-actividad. Por ejemplo, las antocianinas aisladas de *Aronia melanocarpa* han demostrado inhibir la actividad mutagénica de compuestos como α -benzopireno y 2-aminofluoreno en el test de Ames (Gasiorowski *et al.*, 1997),

evidenciando propiedades antimutagénicas. Además, la capacidad de estas moléculas para inhibir las CYP podría considerarse antimutagénica, dado que estas enzimas están implicadas en la carcinogénesis en varios órganos y contribuyen a la toxicidad y al daño al ADN.

En este contexto, diversos estudios de modelado (Langowski & Long, 2002; Kirton, 2002) han investigado la relevancia del conjunto de enzimas CYP y su interacción con diversas moléculas. Esto ha motivado la búsqueda predictiva y selectiva dentro de la familia de antocianinas, así como de sus precursores y derivados, de modelos QSAR (Bentz *et al.*, 2017; Duchowicz *et al.*, 2019) que relacionen la estructura molecular, codificada a través de descriptores moleculares (Todeschini & Consonni, 2009, con actividades biológicas específicas (Pomilio *et al.*, 2019).

En esta Tesis hemos desarrollado modelos QSAR innovadores, simples y fácilmente interpretables para evaluar una serie de derivados de antocianinas como inhibidores de CYP3A4. Esto se realiza mediante la comparación de los valores experimentales de la constante de inhibición (K_i de CYP3A4 con los obtenidos a partir de modelos predictivos. Para este propósito, se empleó análisis de regresión lineal multivariable (MLR, una técnica ampliamente utilizada en estudios QSAR previos, que permite establecer relaciones hipotéticas entre las estructuras químicas y sus actividades biológicas (Ortiz *et al.*, 2017; Fioressi *et al.*, 2019).

En este estudio, se desarrollaron modelos QSAR de regresión lineal univariable para predecir la actividad inhibidora de CYP3A4 en un conjunto molecular compuesto por 16 antocianinas. Posteriormente, se compararon estos modelos con un modelo QSAR tridimensional (3D QSAR) previamente descrito (Shityakov *et al.*, 2014).

7.3.1. Conjunto molecular en estudio y datos de la actividad inhibitoria experimental

Se seleccionaron 10 antocianinas y 6 antocianidinas para las que se disponía de datos experimentales de las actividades inhibitorias de citocromo P450 3A4 (Shityakov *et al.*, 2014) y se expresaron como el logaritmo decimal negativo de la constante de inhibición experimental (pK_i), obteniendo los valores de concentración inhibitoria media (pIC_{50}) (Selvaraj *et al.*, 2011) de acuerdo con la ecuación de interacción enzima-sustrato de Michaelis-Menten para especies no competitivas. El parámetro pK_i varía en el intervalo (3,6030 - 4,9100). Los compuestos seleccionados para este estudio son: cianidina (**1**), cianidina-3,5-di-O-glucósido (**2**), cianidina-3-O-galactósido (**3**), cianidina-3-O-glucósido (**4**), cianidina-3-O-rutinósido (**5**), delphinidina-3-O-glucósido (**6**), malvidina-3,5-di-O-glucósido (**7**), malvidina-3-O-galactósido (**8**), malvidina-3-O-glucósido (**9**), pelargonidina (**10**), peonidina (**11**), petunidina (**12**), delphinidina (**13**), malvidina (**14**), pelargonidina-3,5-di-O-glucósido (**15**), peonidina-3-O-glucósido (**16**).

7.3.2. Desarrollo de los modelos QSAR para la actividad antimutagénica

Las estructuras químicas de las 16 antocianinas se generaron utilizando el software gratuito ACDLabs/ChemSketch (2019), exportándolas en formato MDL mol (V2000). Para convertir estos archivos a otros formatos, se empleó el programa Open Babel para Windows (2019). En el presente trabajo, se calcularon descriptores moleculares convencionales independientes de la conformación a partir de distintas herramientas computacionales, detalladas a continuación.

El programa PaDEL versión 2.20 (2019), fue utilizado debido a su carácter de código abierto y libre acceso. Este software permite el cálculo de 17.536 descriptores moleculares de tipo 0D-2D, junto con diversas huellas dactilares. Complementariamente, se utilizó PyDescriptor (Masand & Rastija, 2017), que calcula un conjunto diverso de 16.299 descriptores moleculares de tipo 1D-2D, los cuales codifican patrones farmacofóricos, fragmentos atómicos y otras huellas dactilares estructurales.

Además, con el software Mold2 (Hong *et al.*, 2008), se calcularon 777 variables estructurales 1D-2D. Estas fueron generadas a partir de moléculas en formato MDL sdf, proporcionando descriptores moleculares fácilmente comprensibles. Para explorar descriptores moleculares más avanzados, se utilizó la suite QuBiLs-MAS (Valdés-Martín *et al.*, 2017). Este módulo calcula 67.584 descriptores 2D basados en mapas cuadráticos, bilineales y lineales, contruidos a partir de matrices de densidad electrónica pseudográfica y ponderaciones atómicas, utilizando invariantes como 'distancia euclidiana', 'media aritmética' y 'desviación estándar'.

Por último, se empleó el software que pertenece al programa ISIDA (*In Silico Design and data Analysis*), ISIDA/Fragmentor (2017), para contabilizar átomos y fragmentos estructurales lineales con longitudes de 2 a 5 átomos, generando un total de 64 posibles tipos de fragmentos y átomos para este conjunto de datos. Todas las moléculas analizadas se procesaron en formato MDL sdf (*Structure Data File*).

En total, se exploraron 102.260 descriptores moleculares no conformacionales sobre los derivados catiónicos de antocianinas. Estos descriptores capturan las características estructurales más relevantes que influyen en la actividad antimutagénica estudiada, proporcionando una base robusta para los análisis QSAR realizados en esta Tesis.

El análisis inicial del conjunto de 102.260 descriptores moleculares no conformacionales tuvo como objetivo eliminar aquellos que presentaban colinealidad, es decir, información estructural redundante. Para ello, se identificaron pares de descriptores linealmente dependientes y se conservó únicamente una variable representativa de cada par. Este proceso permitió reducir el conjunto a 47.117 descriptores linealmente independientes, facilitando el análisis posterior.

En el desarrollo de los modelos QSAR, se adoptó la "regla empírica" (Tute, 1971), ampliamente aceptada en estudios QSAR con datos experimentales limitados. Según esta regla, es necesario contar con al menos seis observaciones experimentales por variable para minimizar el riesgo de sobreajuste y evitar correlaciones espúreas. Por esta razón, se optó por establecer modelos de regresión lineal univariable, identificando los descriptores que

proporcionar los menores valores de RMSE o la desviación estándar (S) en el conjunto de entrenamiento.

Para construir y validar los modelos, las 16 moléculas de antocianinas se dividieron en dos subconjuntos: un *conjunto de entrenamiento* (12 compuestos, 75%), utilizado para ajustar los modelos, y un *conjunto de validación* (4 compuestos, 25%), destinado a evaluar su capacidad predictiva. Esta división se realizó empleando dos enfoques:

- **Método de selección aleatoria:** Implementado mediante el módulo Strike 1.9 integrado en la suite de modelado molecular Maestro 9.1 (2019), siguiendo la metodología descrita por Shityakov y colaboradores (Shityakov *et al.*, 2014).
- **Método de Subconjuntos Balanceados (BSM):** Propuesto por Rojas *et al.* (2015) y desarrollado por nuestro grupo, este método asegura la generación de subconjuntos equilibrados, de modo que los conjuntos de entrenamiento y prueba reflejen relaciones estructura-propiedad similares, en lugar de depender de una selección aleatoria.

Además, cada modelo se sometió a validación teórica mediante el enfoque de validación cruzada LOO, ampliamente utilizado para evaluar la robustez y estabilidad de modelos predictivos. Adicionalmente, se calcularon parámetros de validación complementarios según las recomendaciones de la literatura especializada (Chirico & Gramatica, 2012; Roy *et al.*, 2013), asegurando un análisis riguroso y estadísticamente sólido de los modelos generados.

7.3.3. Resultados y discusión

El conjunto reducido de 47.117 descriptores linealmente independientes fue analizado para identificar modelos de regresión lineal univariable. Se seleccionaron aquellos que minimizaban RMSE en el conjunto de entrenamiento. Una vez identificado el modelo inicial, se evaluaron criterios adicionales, como el RMSE en el conjunto de validación, los resultados de validación cruzada, el número de compuestos atípicos y otras estrategias de validación teórica, para garantizar la calidad y confiabilidad del modelo.

Siguiendo la metodología de partición aleatoria empleada en estudios previos (Shityakov *et al.*, 2014), se desarrolló un modelo QSAR basado en un descriptor molecular seleccionado entre los 47.117 disponibles:

(1):

$$pK_i = -0,0029 d_i + 5,33$$

(Ec. 7.9)

$$N_{cat} = 12; R_{cat}^2 = 0,97; RMSE_{cat} = 0,07; o_{2,5} = 0$$

$$N_{val} = 4; R_{val}^2 = 0,98; RMSE_{val} = 0,10; R_{loo}^2 = 0,95; RMSE_{loo} = 0,09$$

$$R_{rand}^2 = 0,94; RMS_{rand} = 0,09; R_m^2 = 0,86$$

Este modelo **(1)**, descrito por la **Ecuación 7.9**, no presenta compuestos atípicos en el conjunto de entrenamiento con residuos superiores a 2,5 veces S_{cal} ($o2,5$), como se detalla en la **Figura 7.6 (A)**.

El modelo fue validado mediante diversas técnicas. La aleatorización de la variable dependiente (*Y-randomization*) (Rücker *et al.*, 2007) demostró que el modelo tiene valores de $RMSE_{cal}$ menores que $RMSE_{rand}$ y R_{rand}^2 inferiores a R_{cal}^2 , confirmando que la relación establecida entre la estructura molecular y el pK_i no es producto de una correlación aleatoria. Además, la validación cruzada LOO (Golbraikh & Tropsha, 2002) mostró resultados satisfactorios ($R_{loo}^2 > 0,5$), y el índice R_m^2 (Roy *et al.*, 2009) también fue aceptable ($R_m^2 > 0,5$), respaldando la solidez del modelo.

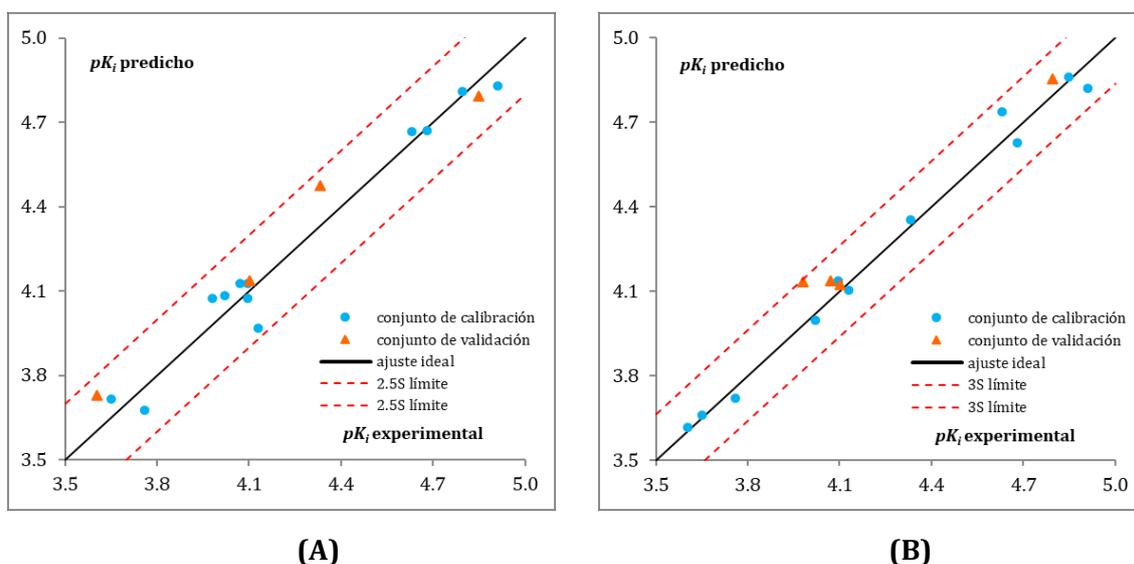


Figura 7.6. Constantes de inhibición predichas y experimentales para diferentes antocianinas según: **(A) Ecuación 7.9**; y **(B) Ecuación 7.10**.

El poder predictivo de la **Ecuación 7.9** fue evaluado utilizando un conjunto de validación externo de cuatro antocianinas. Los resultados indicaron que estas moléculas se encuentran dentro del dominio de aplicabilidad (AD) del modelo (Eriksson *et al.*, 2003), ya que sus valores de influencia (h) son menores que el límite de advertencia ($h^* = 0,5$). El gráfico de Williams correspondiente, que relaciona los residuos estandarizados con los valores de influencia, se presenta en la **Figura 7.7**.

El descriptor molecular d_1 , calculado con QuBiLs-MAS, desempeña un papel clave en este modelo. Este descriptor, denotado como N2_Q_AB_nCi_2_DS14_T_KA_psa_MAS, representa un índice cuadrático global no quiral basado en átomos de orden 14, calculado a partir de matrices de densidad electrónica de grafos estocásticos (Valdés-Martín *et al.*, 2017). Aunque su interpretación química permanece oculta tras su definición algebraica, su importancia radica en que permite predecir el pK_i según el signo del coeficiente de regresión en la **Ecuación 7.9**. Valores mayores de d_1 predicen un menor pK_i (mayor potencia inhibitoria) para antocianinas dentro del AD.

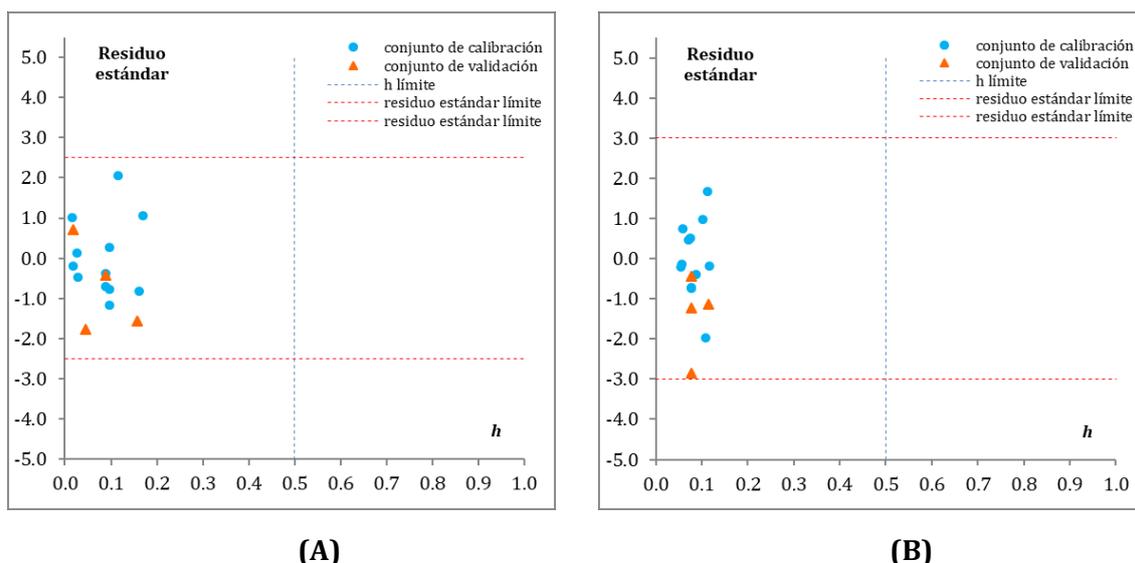


Figura 7.7. Residuos estandarizados en función del parámetro de influencia, según: **(A) Ecuación 7.9;** y **(B) Ecuación 7.10.** Se indica la influencia límite.

Empleando un método de partición más racional como BSM (Rojas *et al.*, 2015), se desarrolló un segundo modelo QSAR descrito por la **Ecuación 7.10**:

(2):

$$pK_i = 0,45 d_2 + 0,84 \tag{Ec. 7.10}$$

$$N_{cat} = 12; R_{cat}^2 = 0,99; RMSE_{cat} = 0,05; \sigma = 0$$

$$N_{val} = 4; R_{val}^2 = 0,98; RMSE_{val} = 0,09; R_{loo}^2 = 0,98; RMSE_{loo} = 0,06$$

$$R_{rand}^2 = 0,91; RMS_{rand} = 0,13; R_m^2 = 0,94$$

Este modelo **(2)** muestra una calidad estadística superior a la de la **Ecuación 7.9**, como se observa en las predicciones de pK_i (**Figura 7.6 (B)**) y el análisis del dominio de aplicabilidad (**Figura 7.7 (B)**), donde las moléculas del conjunto de validación permanecen dentro del AD. Estos resultados subrayan la mejora en la capacidad predictiva y la robustez estadística lograda con el método BSM.

Para fortalecer la validez de las **Ecuaciones 7.9 y 7.10**, se incorporaron parámetros adicionales de validación propuestos en la literatura, como $Q_{F1}^2, Q_{F2}^2, Q_{F3}^2, CCC, R_m^2, R_m'^2, \Delta R_m^2$ y $\overline{R_m^2}$, cuyos resultados se presentan en la **Tabla 7.3**. Los valores obtenidos indican un desempeño estadístico satisfactorio para ambos modelos QSAR.

El descriptor más relevante identificado para la **Ecuación 7.10** fue d_2 , calculado mediante el software QuBiLS-MAS y denotado como SD_B_AB_nCi_2_SS1_D_KA_psa-r_MAS. Este descriptor representa un índice bilineal local y no quirral asociado a donantes de enlaces de hidrógeno (átomos de N y O enlazados con H). Se calcula a partir de la matriz de densidad electrónica estocástica simple de primer orden de un pseudografo molecular,

integrando la desviación estándar como invariante y utilizando tanto el área de superficie polar topológica y la refractividad, como pesos atómicos (Valdés-Martini *et al.*, 2017).

Tabla 7.3. Parámetros de validación para los modelos QSAR obtenidos.

Modelo	Q_{F1}^2	Q_{F2}^2	Q_{F3}^2	CCC	R_m^2	R'_m	ΔR_m^2	\overline{R}_m^2
(1)	0,95	0,95	0,94	0,97	0,86	0,83	0,04	0,84
(2)	0,92	0,92	0,96	0,96	0,94	0,91	0,02	0,93

Para la **Ecuación 7.10**, se establece una guía QSAR relevante: cuanto menor sea el valor del descriptor d_1 , menor será el pK_i predicho, lo que indica una mayor capacidad inhibitoria para las antocianinas dentro del AD del modelo.

Los resultados de las **Ecuaciones 7.9 y 7.10** se compararon con modelos 3D-QSAR previos basados en los modelos estadísticos de análisis comparativo de campo molecular (CoMFA, *Comparative Molecular Field Analysis*) y análisis comparativo de índices de similitudes moleculares (CoMSIA, *Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*) (Shityakov *et al.*, 2014), cuyos parámetros estadísticos se resumen en la **Tabla 7.4**. Los modelos desarrollados en este estudio demostraron un mejor desempeño predictivo en el conjunto de validación, tanto al emplear partición aleatoria como al utilizar el BSM.

Tabla 7.4. Calidad estadística de los modelos 3D-QSAR y el presente estudio para predecir la constante de inhibición.

Modelo	R_{train}^2	RMS_{train}	R_{test}^2	RMS_{test}
CoMFA+	0,96	0,08	0,82	0,20
CoMSIA+	0,95	0,09	0,81	0,20
(1)	0,97	0,07	0,98	0,10
(2)	0,99	0,05	0,98	0,09

La principal ventaja del enfoque QSAR independiente de la conformación empleado aquí radica en la utilización de un gran número de descriptores moleculares de tipo 0D-2D, que se basan exclusivamente en representaciones constitucionales y topológicas de las estructuras químicas, evitando la necesidad de información conformacional (Duchowicz *et al.*, 2015; Aranda *et al.*, 2016; Ortiz *et al.*, 2017; Fioressi *et al.*, 2019). Esta estrategia se refleja en la predicción precisa de las antocianinas con isomería, como cianidina-3-*O*-galactósido y cianidina-3-*O*-glucósido, y malvidina-3-*O*-galactósido y malvidina-3-*O*-glucósido, todas dentro del AD.

Aunque las **Ecuaciones 7.9 y 7.10** muestran una capacidad predictiva aceptable en los conjuntos de entrenamiento y prueba, es necesario considerar ciertas limitaciones inherentes al modelo. El uso de un conjunto reducido de datos experimentales y el análisis de un elevado número de descriptores incrementan el riesgo de correlaciones aleatorias, a

pesar de las rigurosas evaluaciones de desempeño realizadas. Por ello, se recomienda ampliar la base de datos experimental en futuros estudios para fortalecer los modelos QSAR desarrollados y mejorar la comprensión de la inhibición de la actividad antimutagénica debida a antocianinas.

7.3.4. Conclusiones de los QSAR obtenidos para la actividad antimutagénica

El uso de diversas herramientas gratuitas para el cálculo de descriptores moleculares, que han demostrado ser efectivas en un conjunto específico de datos, constituye un recurso invaluable para los estudios QSAR. Asimismo, la implementación de una partición adecuada del conjunto molecular, que tenga en cuenta las relaciones estructura-actividad en los conjuntos de entrenamiento y prueba, contribuye significativamente a mejorar la calidad estadística de los modelos QSAR desarrollados.

En este trabajo, por primera vez, el análisis de 102.260 descriptores moleculares no conformacionales mediante modelos de regresión lineal univariable ha demostrado una capacidad predictiva superior en el conjunto de validación, en comparación con técnicas más avanzadas como CoMSIA y CoMFA. Si bien algunos descriptores moleculares pueden carecer de una interpretación química directa debido a su naturaleza matemática compleja, su valor radica en la capacidad predictiva, permitiendo establecer guías QSAR. Estas guías resultan fundamentales para orientar la síntesis de nuevas antocianinas con niveles predichos de actividad antimutagénica alta o baja.

7.4. Análisis QSAR de la actividad anticarcinogénica evaluada en la línea celular MCF-7

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres, representando alrededor del 24,5% de los casos nuevos de cáncer en 2020 y siendo responsable de más de 680.000 muertes anuales a nivel mundial (Sung *et al.*, 2021). Afecta tanto a mujeres como a hombres, aunque en estos últimos es mucho menos común, representando sólo alrededor del 1% de los casos (Bray *et al.*, 2012). A pesar de los avances significativos en el diagnóstico temprano y los tratamientos, incluyendo cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapias hormonales, la mortalidad asociada al cáncer de mama sigue siendo elevada, especialmente en países con menor acceso a atención médica (DeSantis *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2022). Los desafíos actuales incluyen la resistencia al tratamiento y los efectos secundarios severos, lo que subraya la necesidad de desarrollar terapias más efectivas y menos tóxicas (Siegel *et al.*, 2022).

En este contexto, los compuestos naturales, como los flavonoides, han ganado una atención significativa debido a sus efectos antioxidantes y anticarcinogénicos (Cheynier *et al.*, 2015; Khoo *et al.*, 2017; Mitra *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2024). La actividad antioxidante de los flavonoides ayuda a neutralizar los radicales libres y otras ROS como el peróxido de

hidrógeno, todas especies químicas altamente reactivas que se generan en los procesos metabólicos normales y que pueden causar daño celular, contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades crónicas, como cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Valko *et al.*, 2007; Phaniendra *et al.*, 2015; Pizzino *et al.*, 2017; Teles *et al.*, 2018). Cuando está presente en exceso, el canferol, como flavonol, muestra propiedades antioxidantes en condiciones cobre (Cu)-Fenton (Simunkova *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el canferol es eficaz en el tratamiento de cánceres de mama, esófago, cuello uterino, ovario e hígado, así como en la leucemia, probablemente debido a las propiedades pro-oxidantes de los complejos Cu-canferol y la activación de vías pro-apoptóticas. Por lo tanto, los flavonoides son moléculas adecuadas para la prevención o el tratamiento de afecciones médicas relacionadas con el estrés oxidativo, que implican un metabolismo alterado de metales redox como el cobre, tales como la enfermedad de Menkes y los trastornos neurológicos, incluida la enfermedad de Alzheimer (Simunkova *et al.*, 2021).

Dentro de los flavonoides, las antocianinas y sus agliconas, las antocianidinas (He & Giusti, 2010), no sólo sirven para el tratamiento de enfermedades crónicas como la obesidad y la osteoporosis (Pomilio *et al.*, 2024), sino también han demostrado ser particularmente efectivas en la prevención y tratamiento del cáncer a través de diversos mecanismos moleculares, tales como la inducción de apoptosis, la inhibición de la angiogénesis y la reducción de la proliferación celular (Hou *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2017; Rabelo *et al.*, 2023). El estrés oxidativo, causado por la producción excesiva ROS y la disminución de los sistemas antioxidantes endógenos, está estrechamente vinculado al desarrollo de diversas patologías, incluido el cáncer (Valko *et al.*, 2007; Halliwell, 2012). Se ha demostrado que las antocianinas, tienen la capacidad de reducir el estrés oxidativo al neutralizarlos, lo que podría ser una de las bases de su actividad anticarcinogénica (Khoo *et al.*, 2017; Mattioli *et al.*, 2020). Además, estudios recientes sugieren que estos compuestos no sólo actúan como antioxidantes, sino que también influyen en diversas vías de señalización celular, modulan la expresión génica y afectan el microambiente tumoral (Lin *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2021; Rabelo *et al.*, 2023).

Hemos extendido nuestro enfoque QSAR al análisis de la actividad anticarcinogénica de flavonoides, particularmente antocianinas y antocianidinas, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*). Esta línea celular es muy utilizada en estudios preclínicos debido a su capacidad para retener características específicas del cáncer de mama, incluyendo la expresión de receptores hormonales y la respuesta a agentes quimioterapéuticos (Soule *et al.*, 1973). Utilizando el ensayo colorimétrico de viabilidad celular MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-íl)-2,5-difeniltetrazolio) a 48 y 72 horas, hemos correlacionado diversos descriptores moleculares con la actividad anticarcinogénica de los compuestos, con el objetivo de identificar nuevas moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento del cáncer de mama (Mosmann, 1983).

7.4.1. Conjunto molecular en estudio y datos de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) experimental

Se realizó una búsqueda exhaustiva en diversas bases de datos científicas para seleccionar un grupo de 40 antocianinas, compuestos relacionados de la familia de los flavonoides y moléculas de estructura similar, con el fin de evaluar su actividad antitumoral frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Considerando los aspectos experimentales del ensayo para la evaluación de la actividad, los compuestos fueron divididos en dos conjuntos de datos. El primer conjunto incluyó 23 moléculas, analizadas tras un tiempo de incubación de 48 horas (**p1**) (Zhang *et al.*, 2005; Vareed *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Ranganathan *et al.*, 2015; Sudha *et al.*, 2018; Goodarzi *et al.*, 2020; Santhanakrishnan *et al.*, 2020; Aghaei *et al.*, 2021), mientras que el segundo conjunto, conformado por 17 moléculas, fue evaluado tras 72 horas de incubación (**p2**) (Grigalius & Petrikaite, 2017; Ye *et al.*, 2022). Los compuestos que integran **p1** son: malvidina (**1**), pelargonidina (**2**), delphinidina (**3**), petunidina (**4**), delphinidina-3-*O*-glucósido (**5**), delphinidina-3-*O*-rutinosido (**6**), 5-hidroxi-3',4',7-trimetilflavona (**7**), quercetina (**8**), 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxiflavona-7-*O*-glucósido (**9**), 3,5,7,4'-tetrahidroxi-6,3'-dimetoxiflavona-7-*O*-glucósido (**10**), apigenina-7-*O*-acetilglucósido (**11**), apigenina-7-*O*-acetillactósido (**12**), apigenina-7-*O*-lactósido (**13**), acacetina-7-*O*-acetilglucósido (**14**), 4'-*O*-bencilapigenina-7-*O*-acetilglucósido (**15**), luteolina (**16**), luteolina-7-*O*-glucósido (**17**), apigenina-7-*O*-glucósido (**18**), cuminoide A (**19**), α -mangostina (**20**), 3,6-diacetil- α -mangostina (**21**), γ -mangostina (**22**) y 3,6,7-triacetil- γ -mangostina (**23**). Por otro lado, los compuestos que integran **p2** son: 3',4'-dihydroxiflavonol (**24**), 3,3',6-trihydroxiflavona (**25**), 3,3',7-trihydroxiflavona (**26**), 3,4',7-trihydroxiflavona (**27**), 3',4',5-trihydroxiflavona (**28**), 2',5,7-trihydroxiflavona (**29**), 2',3',6-trihydroxiflavona (**30**), 3',4',6-trihydroxiflavona (**31**), 3',6,7-trihydroxiflavona (**32**), 2',7,8-trihydroxiflavona (**33**), 4',7,8-trihydroxiflavona (**34**), apigenina (**35**), baicaleína (**36**), 5-hidroxinoracronicina (**37**), 1,6-dihidroxi-2,3,4-trimetoxi-9(10*H*)-acridona (**38**), 3',4',5,6,7,8-hexametoxiflavonol (**39**) y 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavanona (**40**).

Para obtener una mejor distribución de los datos experimentales, los valores de IC_{50} (concentración inhibitoria media) se transformaron a unidades logarítmicas naturales, logrando que los valores de $\ln(IC_{50})$ oscilaran entre 1,05 y 5,14.

7.4.2. Desarrollo de los modelos QSAR para la actividad anticarcinogénica

Las estructuras de las moléculas fueron dibujadas utilizando el software gratuito ACDLabs/ChemSketch (2019) en formato MDL mol (V2000). Posteriormente, todas las conversiones de formato de archivo se llevaron a cabo utilizando el software Open Babel para Windows (2019). En el presente trabajo, se calcularon descriptores moleculares convencionales independientes de la conformación a partir de distintas herramientas computacionales, detalladas a continuación.

El programa PaDEL versión 2.20 (2019), fue utilizado debido a su carácter de código abierto y libre acceso. Este software permite el cálculo de 17.536 descriptores moleculares de tipo 0D-2D, junto con diversas huellas dactilares.

Además, con el software Mold2 (Hong et al., 2008), se calcularon 777 variables estructurales 1D-2D. Estas fueron generadas a partir de moléculas en formato MDL sdf, proporcionando descriptores moleculares fácilmente comprensibles.

Se empleó el software ISIDA/Fragmentor (2017) para contabilizar átomos y fragmentos estructurales lineales con longitudes de 2 a 5 átomos, generando un total de 254 posibles tipos de fragmentos y átomos para este conjunto de datos. Todas las moléculas analizadas se procesaron en formato MDL sdf. Complementariamente, se generaron 3.072 descriptores moleculares observando los aspectos estructurales de las moléculas analizadas en los dos conjuntos moleculares.

Por último, se utilizó el software MD-LOVIs 1.0 (*Molecular Descriptors from Local Vertex Invariants and Related Maps*) para el cálculo de 48.400 descriptores moleculares a partir de LOVIs (*Local Vertex Invariants*) o vectores ponderados atómicos (Martínez-López et al., 2020).

En total, se exploraron 70.039 descriptores moleculares no conformacionales para los conjuntos **p1** y **p2**. Estos descriptores capturan las características estructurales más relevantes de las antocianinas, flavonoides y moléculas estructuralmente relacionadas, que influyen en la actividad anticarcinogénica estudiada, permitiendo el desarrollo de los modelos QSAR.

Se eliminaron las variables no informativas, como los descriptores repetidos (colineales), los descriptores que tienen un único valor no constante y los descriptores con valores faltantes. Esto da como resultado D=32.185 descriptores para **p1** y D=29.259 descriptores para **p2**.

Debido a que los estudios QSAR suelen trabajar con conjuntos de datos limitados, la "regla empírica" (Tute, 1971) sugiere que es necesario contar con al menos seis observaciones experimentales por variable para evitar el sobreajuste y la correlación espuria. Para cumplir con esta recomendación, se optó por desarrollar modelos de regresión lineal multivariable, seleccionando los descriptores más relevantes mediante la minimización de RMSE y la desviación estándar (S) del modelo.

El conjunto **p1** de 23 moléculas se dividió en dos grupos: un *conjunto de entrenamiento* (19 compuestos, 82% del total) para el ajuste del modelo, y un *conjunto de validación* (4 compuestos, 18% del total) para la validación. De manera similar, en el conjunto **p2**, formado por 17 moléculas, se emplearon 14 compuestos (82%) para el *conjunto de entrenamiento* y 3 compuestos (18%) para el *conjunto de validación*. La división de los conjuntos se llevó a cabo utilizando BSM (Rojas et al., 2015). Este procedimiento asegura que los subconjuntos generados sean representativos del conjunto total, manteniendo relaciones estructura-actividad similares entre los datos de entrenamiento y validación.

La selección de los descriptores moleculares se realizó con el Método del reemplazo (RM, *Replacement Method*), lo que permitió desarrollar modelos de regresión lineal multivariable (Duchowicz et al., 2006). Este enfoque facilitó la identificación de los

descriptores más relevantes entre los 32.185 y 29.259 disponibles para **p1** y **p2** respectivamente, optimizando los valores de RMSE y desviación estándar (S) para el conjunto de entrenamiento. Además de utilizar un conjunto de validación independiente, se validaron los modelos mediante validación cruzada LOO (Golbraikh & Tropsha, 2002; Wold *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2016).

7.4.3. Resultados y discusión

Para las actividades **p1** y **p2**, se seleccionaron inicialmente 32.185 y 29.259 descriptores moleculares respectivamente. A partir de estos, se identificaron los mejores modelos de regresión lineal univariados mediante la minimización de RMSE en el conjunto de entrenamiento. Este análisis preliminar permitió identificar los descriptores más relevantes, optimizando inicialmente los valores de RMSE. Posteriormente, se establecieron diversos criterios para evaluar los modelos resultantes, con el objetivo de seleccionar el modelo lineal más adecuado para cada actividad.

Entre los criterios de evaluación considerados se incluyen: el valor del RMSE en el conjunto de validación, los resultados obtenidos a través de la validación cruzada (LOO), el número de compuestos considerados como outliers (o), y otros parámetros de validación teórica que aseguran la robustez de los modelos. Este proceso de optimización condujo a la selección de modelos QSAR multivariados, compuestos por tres descriptores para **p1** y dos descriptores para **p2**, seleccionados entre los descriptores moleculares no conformacionales disponibles:

p1 (48h):

$$pK_i = 0,0754 d_1 - 4,95 d_2 + 14,61 d_3 + 5,51$$

(Ec. 7.11)

$$N_{cal} = 19; R_{cal}^2 = 0,88; RMSE_{cal} = 0,42; o_{2,5} = 0; R_{ijmáx}^2 = 0,56$$

$$N_{val} = 4; R_{val}^2 = 0,95; RMSE_{val} = 0,50; R_{loo}^2 = 0,81; RMSE_{loo} = 0,53$$

p2 (72h):

$$pK_i = 29,57 d_4 + 0,48 d_5 - 25,453$$

(Ec. 7.12)

$$N_{cal} = 14; R_{cal}^2 = 0,86; RMSE_{cal} = 0,23; o_{2,5} = 0; R_{ijmáx}^2 = 0,19$$

$$N_{val} = 3; R_{val}^2 = 0,94; RMSE_{val} = 0,27; R_{loo}^2 = 0,82; RMSE_{loo} = 0,27$$

La selección de tres descriptores para el modelo de **p1** y dos descriptores para **p2** se justifica por los coeficientes de correlación entre pares de descriptores. En el caso de **p1**, se obtuvo un coeficiente de correlación máximo entre pares $R_{ijmáx}^2 = 0,56$, mientras que para **p2** fue de $R_{ijmáx}^2 = 0,19$. Estos valores sugieren que no hay una superposición significativa

de la información estructural entre los descriptores seleccionados en cada modelo, lo que respalda su independencia y validez. Los índices topológicos que aparecen en estas ecuaciones derivan de los programas PADEL y MD-LOVIs. Para su cálculo se utilizan diversos pesos atómicos, LOVIs clásicos y operadores de agregación (Martínez-López *et al.*, 2020). Aunque la interpretación química de dichas variables permanece oculta tras su definición algebraica, estos descriptores son importantes para tipificar las estructuras químicas. La clasificación de los descriptores seleccionados se muestra en la **Tabla 7.5**.

Tabla 7.5. Nomenclatura para los mejores descriptores moleculares seleccionados.

<i>Descriptor</i>	<i>Tipo de descriptor</i>	<i>Símbolo</i>
d_1	PADEL	ZMIC1
d_2	MD-LOVIs	7TS-NE(N2)-C-WH-CB
d_3		7TS-NE(M)-C-WH-IS
d_4		MI-NE(N2)-S-WH-T
d_5		4TS-NE(DE)-BD-WH-HT

Los signos de los coeficientes de regresión, así como los valores numéricos de los descriptores, determinan la magnitud de la actividad predicha por cada modelo. En ambos casos, las **Ecuaciones 7.11** y **7.12** revelan que cuanto menor sea el valor de IC_{50} predicho, mayor será la actividad anticarcinogénica del compuesto evaluado.

Las representaciones gráficas de las predicciones en función de los valores experimentales se muestran en la **Figura 7.8**, observando una tendencia lineal, lo que revela la idoneidad de los modelos lineales y destaca la capacidad de los modelos para reproducir la actividad biológica de los compuestos. No se obtienen compuestos atípicos a partir de estas ecuaciones QSAR, ya que los residuos (diferencia entre la actividad experimental y la predicha) son inferiores a 2,5 veces S_{cal} (2,5S límite).

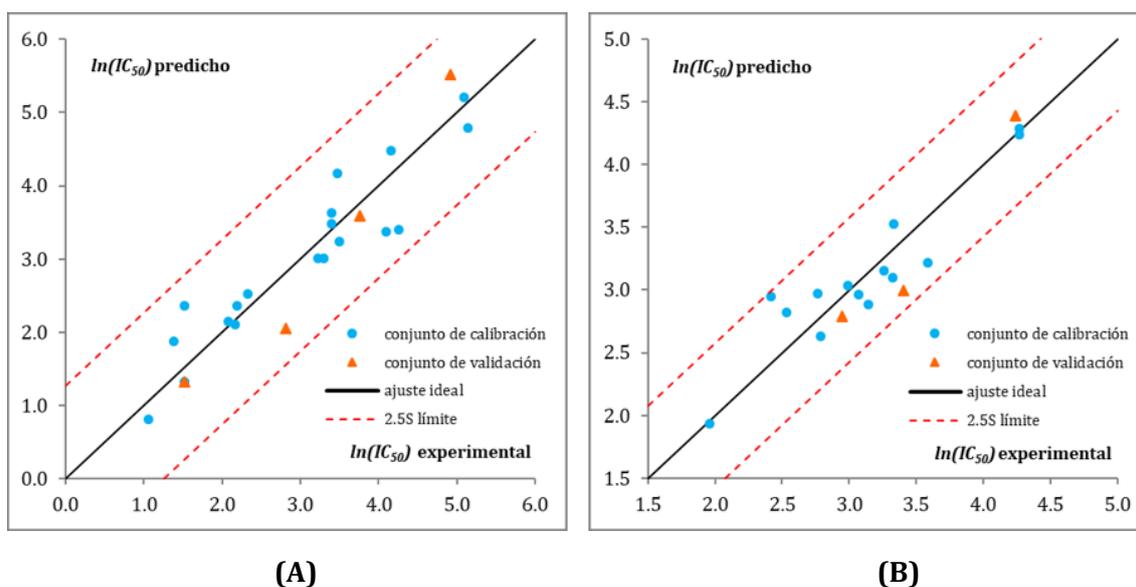


Figura 7.8. Actividades antimutagénicas predichas y experimentales para diferentes compuestos según: (A) Ecuación 7.11; y (B) Ecuación 7.12.

Los resultados indicaron que estas moléculas se encuentran dentro del dominio de aplicabilidad (AD) del modelo (Eriksson *et al.*, 2003), ya que sus valores de influencia (h) son menores que el límite de advertencia ($h^* = 0,63$ para **p1** y $h^* = 0,64$ para **p2**). El gráfico de Williams correspondiente, que relaciona los residuos estandarizados con los valores de influencia, se presenta en la **Figura 7.9**.

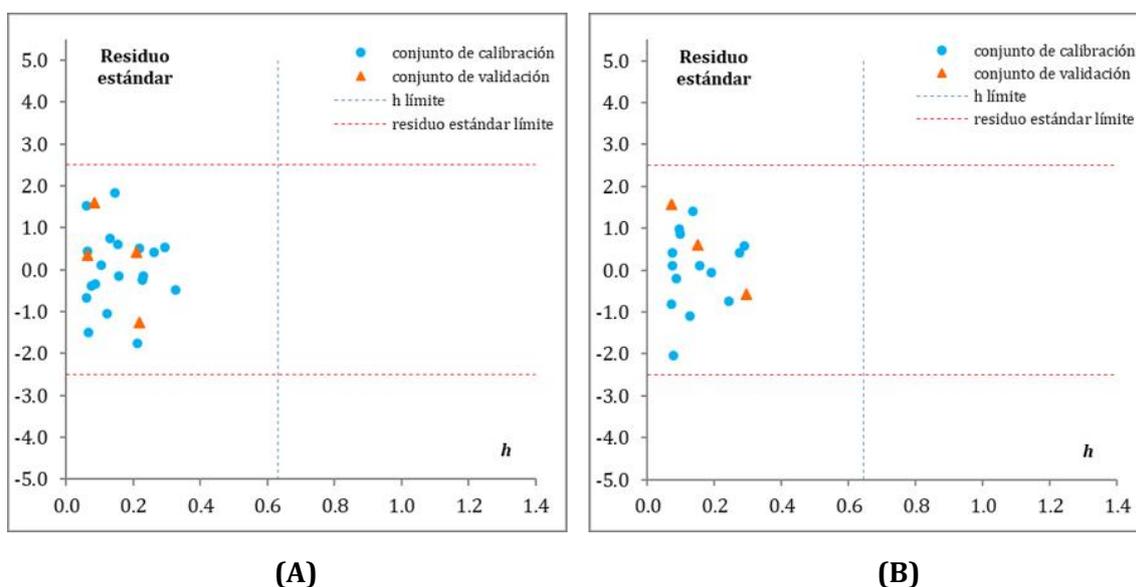


Figura 7.9. Residuos estandarizados en función del parámetro de influencia, según: **(A) Ecuación 7.11**; y **(B) Ecuación 7.12**. Se indica la influencia límite.

Como aplicación práctica de los modelos QSAR obtenidos, se realizó la predicción de bioactividades para 21 antocianinas y flavonoides estructuralmente relacionados, cuyas actividades experimentales son desconocidas (compuestos **41-61**), presentados en la **Tabla 7.6**. Los descriptores correspondientes a estos compuestos fueron calculados siguiendo la metodología previamente descrita. Los resultados obtenidos indican que algunas de estas predicciones pueden considerarse confiables, siempre que los compuestos se encuentren dentro del dominio de aplicabilidad (AD) de los modelos establecidos, lo que puede evaluarse mediante el valor h . Asimismo, para que estas predicciones sean consistentes, deben situarse dentro del rango experimental de variabilidad de bioactividad definido por los modelos, que corresponde a (1,053 - 5,1399) para **p1** y (1,9615 - 4.2697) para **p2**, expresados en unidades logarítmicas.

Tabla 7.6. Actividad anticarcinogénica prevista para 21 compuestos con valores desconocidos. El parámetro *h* aparece entre paréntesis.

	<i>Compuesto</i>	<i>Ec. 7.11</i>	<i>Ec. 7.12</i>
41	Cianidina	5,658 (0,276)	2,477 (0,069)
42	Peonidina	5,504 (0,209)	2,197 (0,148)
43	Apigenidina	5,299 (0,161)	3,850 (0,204)
44	Luteolina	5,392 (0,198)	2,608 (0,070)
45	Capensinidina	3,763 (0,051)	2,721 (0,409)
46	Aurantinidina	5,950 (0,338)	3,197 (0,073)
47	Europinidina	4,153 (0,065)	1,815 (0,329)
48	Rosinidina	4,610 (0,087)	2,169 (0,146)
49	Cation flavilio	8,901 (1,228)	2,375 (6,684)
50	Cianidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosido	3,562 (0,066)	0,608 (1,632)
51	Pelargonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glucopiranosido	3,577 (0,059)	1,457 (1,824)
52	Peonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosido	3,857 (0,074)	0,506 (1,236)
53	Petunidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosido	3,010 (0,060)	0,273 (0,939)
54	Malvidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosido	2,794 (0,064)	0,973 (0,750)
55	Tricetinidina	4,896 (0,149)	2,552 (0,286)
56	Pulchellidina	4,295 (0,081)	2,625 (0,194)
57	Cianidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinósido	3,854 (0,181)	-0,960 (2,008)
58	Pelargonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinósido	3,756 (0,159)	-0,470 (2,106)
59	Peonidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinósido	4,216 (0,221)	-1,039 (1,641)
60	Petunidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinósido	3,584 (0,158)	-1,203 (1,407)
61	Malvidina-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -rutinósido	3,480 (0,148)	-0,509 (1,162)

7.4.4. Conclusiones de los modelos QSAR obtenidos para la actividad anticarcinogénica

Por primera vez, el presente estudio ha demostrado la eficacia de los modelos QSAR para predecir la actividad anticarcinogénica de antocianinas, flavonoides y moléculas estructuralmente relacionadas frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Los resultados obtenidos confirman que es posible identificar descriptores moleculares clave que se correlacionan de manera significativa con la actividad biológica de estos compuestos, lo que representa un avance sustancial en la comprensión de los factores estructurales que influyen en su eficacia anticancerígena.

Se desarrollaron modelos predictivos robustos, validados mediante métodos de validación cruzada y conjuntos de pruebas independientes. Estos modelos no sólo permiten predecir la bioactividad de los compuestos evaluados, sino que también proporcionan una base sólida para el diseño racional de nuevas moléculas con potencial terapéutico. La selección rigurosa de descriptores, combinada con la minimización de la multicolinealidad,

ha mejorado la precisión de los modelos, reforzando así su validez y aplicabilidad en la investigación de agentes anticarcinogénicos.

No obstante, el tamaño limitado del conjunto de datos plantea ciertas restricciones que deberían abordarse en estudios futuros. La expansión de la base de datos de compuestos, tanto en diversidad estructural como en cantidad, contribuiría a mejorar la robustez de los modelos y su capacidad de generalización. Este desafío pone de manifiesto la complejidad inherente a la construcción de una base de datos confiable para un grupo molecular tan diverso como el de los flavonoides y, en particular, las antocianinas.

En conclusión, este estudio resalta el potencial de los modelos QSAR como una herramienta valiosa en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticarcinogénica, proporcionando un enfoque racional y eficiente para el desarrollo de terapias más eficaces y personalizadas en el tratamiento del cáncer de mama.

7.5. Conclusiones del Capítulo 7

Los modelos QSAR han sido ampliamente utilizados para establecer relaciones cuantitativas entre la estructura molecular y diversas actividades biológicas de interés. Sin embargo, más allá de su aplicación convencional en la predicción de bioactividad, estas técnicas también pueden proporcionar información relevante sobre las metodologías experimentales empleadas para la obtención de dichos valores. En este sentido, los modelos QSAR pueden ser una herramienta clave para identificar y diferenciar variaciones asociadas a las condiciones experimentales, permitiendo discriminar entre discrepancias derivadas de diferencias en los protocolos analíticos, el tiempo de ensayo, el tipo de reactivo empleado o incluso la sensibilidad de la técnica utilizada.

Esta aplicación indirecta de los modelos QSAR es de particular interés en el análisis crítico de datos experimentales, ya que permite evaluar la coherencia de los resultados obtenidos a partir de distintas metodologías y detectar posibles inconsistencias que podrían afectar la interpretación de la bioactividad de un compuesto. Al analizar conjuntos de datos que incluyen mediciones obtenidas mediante diferentes técnicas, los descriptores seleccionados en los modelos QSAR pueden reflejar no sólo la interacción entre la estructura química y la actividad biológica, sino también la influencia de factores experimentales en los valores registrados. Esto abre una nueva perspectiva en el uso de la técnica QSAR, en la que los modelos no sólo contribuyen a la predicción de la actividad, sino que también facilitan la estandarización y validación de datos experimentales, optimizando su reproducibilidad y comparabilidad.

A pesar de su relevancia, esta aplicación de los modelos QSAR sigue siendo un campo poco explorado en la literatura científica. Su implementación sistemática podría mejorar significativamente la interpretación de estudios de bioactividad, permitiendo distinguir entre variaciones reales en la respuesta biológica y efectos derivados de diferencias en las condiciones experimentales. De este modo, los modelos QSAR no sólo se consolidan como una herramienta predictiva fundamental, sino que también adquieren un rol crucial en la caracterización y validación de los métodos empleados en la evaluación de actividades biológicas.

**Capítulo 8. Antocianinas de fuentes naturales.
Evaluación de estudios *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos
en humanos**

8.1. Introducción

La osteoartritis o artrosis es una enfermedad articular degenerativa crónica multifactorial discapacitante que se caracteriza por una inflamación pronunciada (Goldring & Otero, 2011), la degradación del cartílago y la erosión ósea, junto con la inflamación sinovial y la formación de osteofitos (Glyn-Jones *et al.*, 2015).

Si bien la fisiopatología de la artrosis hasta el momento no está clara, el cartílago articular y la membrana sinovial son las estructuras articulares primarias sujetas al daño. La membrana sinovial puede afectar a los cambios patológicos en el cartílago articular a través del sistema inmunológico innato, alterando así el progreso de la artrosis (Wang *et al.*, 2018).

Se distinguen varios tipos de artritis: la artritis reumatoide autoinmune, la osteoartritis o artrosis, la gota, la artritis alérgica y la artritis psoriásica. La artritis generalmente afecta a las articulaciones móviles, como las rodillas, la cadera, las manos y la columna vertebral. La artrosis de rodilla es frecuente en mujeres, mientras que la de cadera en hombres.

Los pacientes con artrosis utilizan una variedad de medicamentos analgésicos y antiinflamatorios, por lo que están expuestos a efectos adversos secundarios. Por lo tanto, se adoptan opciones terapéuticas paliativas, como: la medicina regenerativa (Marc, 2018), fisioterapia (Abdel-Aziem *et al.*, 2018); terapia de ejercicios (Goh *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017), balneoterapia (Fioravanti *et al.*, 2017) y terapia con radón (Kojima *et al.*, 2018). Además, se ha utilizado inmunoterapia anticitoquinas, que incluye el anti-factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), anti-interleuquina (IL)-6 y anti-IL-1, aunque se ha asociado con una regulación positiva anormal de los niveles de colesterol total (CT), triglicéridos y colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDLc, *low density lipoprotein cholesterol*) también llamado *colesterol malo* (Strang *et al.*, 2013), así como riesgos cardiovasculares aterotrombóticos (Ait-Oufella *et al.*, 2019). El riesgo de los tratamientos antiinflamatorios es la infección articular (Wang & He, 2018).

El consumo de alimentos juega un papel importante para los pacientes con artrosis, especialmente debido a la función reconocida de una nutrición adecuada en la prevención eficaz, el manejo exitoso y la recuperación gradual (Basu *et al.*, 2018). El tratamiento antiobesidad es parte de la terapia (Deveza & Hunter, 2016) ya que ambas condiciones muestran factores de transcripción y compuestos de señalización en común. Por lo tanto, luchar contra la obesidad es una forma posible de tratar adecuadamente la artrosis.

Las antocianinas han mostrado una baja toxicidad *in vivo*, siendo por lo tanto apropiadas como agentes quimiopreventivos y de tratamiento contra enfermedades crónicas, como diabetes tipo II (Li *et al.*, 2015), síndrome metabólico, antiproliferativas (De Masi *et al.*, 2020), retinopatías, control de la obesidad (Wu *et al.*, 2013b), enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Winter & Bickford, 2019) y trastornos cardiovasculares (Alvarez-Suarez *et al.*, 2014). Sin embargo, las antocianinas de los alimentos demostraron ser más efectivas que los compuestos aislados, probablemente debido a la sinergia con otros compuestos, y principalmente por efectos de la co-pigmentación, como hemos visto en el Capítulo 2.

Actualmente, existen evidencias sobre los efectos beneficiosos de una dieta natural saludable y el uso de suplementos de antocianinas debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Wallace & Giusti, 2019; Cásedas *et al.*, 2020), para aliviar el dolor y la rigidez en la artrosis, contribuyendo a mejorar la actividad diaria y los datos biométricos. Por lo tanto, destacamos en el final de esta Tesis la relevancia clínica de las antocianinas dietarias para la prevención y el manejo de la artrosis y las comorbilidades crónicas.

8.2. Efectos de alimentos ricos en antocianidinas, antocianinas y metabolitos en condrocitos humanos

Las antocianinas se han estudiado extensamente en ensayos *in vitro* e *in vivo* (líneas celulares y modelos animales) y ensayos clínicos. En la presente Tesis se incluyen ensayos en condrocitos humanos y ensayos clínicos en humanos. De cincuenta y dos artículos de investigación, se seleccionaron once estudios en condrocitos de pacientes con artrosis. No se incluyeron condrocitos de otras artritis, como la artritis reumatoide y la gota.

La relevancia de estos estudios es que los condrocitos se obtienen de explantos de cartílago de pacientes con artrosis, se cultivan, se estimulan con IL-1 β y se utilizan para ensayar antocianinas, antocianidinas, metabolitos y extractos de alimentos. Esta es una forma directa de saber si las antocianinas son bioactivas y qué enzimas y/o vías participan en la acción.

La pregunta es por qué analizar pruebas que utilizan condrocitos. El hecho es que, en condiciones normales, existe un equilibrio dinámico entre la apoptosis y la proliferación de los condrocitos articulares, manteniendo la estructura y la función del cartílago articular. Por lo tanto, los condrocitos son el objetivo para modular la degradación del cartílago. Se ha demostrado que la apoptosis de los condrocitos es significativamente mayor en pacientes con artrosis que en controles. Las vías moleculares que conducen a la muerte celular se comportan en respuesta a inductores, como: IL-1 β , TNF- α , leptina, donantes de óxido nítrico (NO) y estrés mecánico (Grässel & Aszodi, 2019). TNF- α actúa sobre la superficie celular para activar las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) y para regular la expresión corriente abajo de la quinasa *N*-terminal c-Jun (JNK, *c-Jun N-terminal Kinase*), la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*) y p38. Las últimas tres quinasas interactúan entre sí para promover la activación selectiva de la familia AP-1 (proteína activadora 1; *activator protein 1*) y para regular la expresión de genes diana. Las antocianinas inhiben la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la transactivación de AP-1, que es un factor de transcripción que regula la expresión del gen *COX-2*, como se muestra en la **Tabla 8.1**, referida a ensayos de antocianinas, metabolitos y extractos de alimentos en condrocitos humanos y en cultivos celulares relacionados.

La citoquina proinflamatoria IL-1 β indujo en los condrocitos humanos la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*), conocidas por participar en la resorción del cartílago y la degradación articular en la artrosis. Los

condrocitos activados produjeron y liberaron las colagenasas MMP-1 y MMP-13, la liasa de matriz MMP-3 y varias agrecanasas, entre ellas la agrecanasa-1 [una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina (ADAMTS: *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)-4] y la agrecanasa-2 (ADAMTS-5), que son enzimas proteolíticas de la familia ADAMTS. Todas estas MMPs y enzimas proteolíticas tienen una función relevante en la degradación de la matriz extracelular (ECM, *Extracellular Matrix*) del cartílago en la artrosis, la apoptosis de los condrocitos y la resorción ósea al inhibir la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II (componente principal de la ECM del cartílago) (Grässel & Aszodi, 2019).

Se analizó el efecto del extracto de fruta de granada (Ahmed *et al.*, 2005; Rasheed *et al.*, 2010), las hojas de morera (Jeong *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2019), las antocianidinas cianidina (Cn), delphinidina (Df) y malvidina (Mv) (Haseeb *et al.*, 2013), los metabolitos de la antocianina como el ácido protocatéquico, florogliceraldehído, ácido vainillínico y ácido ferúlico (Ziadlou *et al.*, 2019), y los *O*-glucósidos como Cn-3-*O*-glucósido, Pn-3-*O*-glucósido y su metabolito ácido protocatéquico de tres cultivares de arroz morado tailandés Thai (Wongwichai *et al.*, 2019) (**Tabla 8.1**).

Las propiedades antiinflamatorias de las antocianinas también se refieren a la inhibición de la biosíntesis de eicosanoides, formados por la oxidación del ácido araquidónico que se encuentra en los fosfolípidos de membrana, u otros ácidos grasos poliinsaturados similares, por las enzimas ciclooxigenasa (COX) y 5-lipooxigenasa (5-LO). La enzima COX-2 participa en la inflamación crónica y el dolor de la artrosis. La actividad antiinflamatoria de las antocianinas y las agliconas se asoció a la inhibición de la cascada COX-2 y su producto, el lípido prostaglandina E₂ (PGE₂) (Haseeb *et al.*, 2013), como se demostró con Cn y Df (Haseeb *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020). La síntesis de PGE₂ se sobre-regula por estímulos proinflamatorios como IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α .

Se demostró que la acción antiinflamatoria y la antidegradación de Cn por parte de la matriz extracelular que disminuye la progresión de la artrosis se produce vía el eje Sirtuína 6 (Sirt6)/NF- κ B (Jiang *et al.*, 2019). La activación de Sirt6 mediada por Cn resultó en una disminución de la respuesta inflamatoria al inhibir la vía de señalización NF- κ B (Jiang *et al.*, 2019) (**Tabla 8.1**).

Las antocianinas aciladas con *p*-cumaroilo provenientes de un cultivar de papa de pulpa púrpura oscura inhibieron la señalización de NF- κ B y STAT1/3 (transductor de señales y activador de la transcripción 1/3) en macrófagos. En consecuencia, disminuyeron las ROS y los mediadores proinflamatorios (Lee *et al.*, 2017). Los porotos rojos (*Phaseolus radiatus* L. var. *aurea*) bloquearon significativamente las respuestas inflamatorias en macrófagos estimulados con LPS al disminuir el NO celular y subregular las expresiones genéticas de iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6 (Chao *et al.*, 2015) (**Tabla 8.1**).

Una de las principales limitaciones de los ensayos (**Tabla 8.1**) es que no se tuvieron en cuenta la cantidad de antocianinas/extracto de alimentos analizados ni el resultado de la relación dosis-respuesta, excepto en el caso de los ensayos con granadas (Ahmed *et al.*, 2005), Cn (Jiang *et al.*, 2019) y Df (Lee *et al.*, 2020). Las fortalezas corresponden a que estos ensayos mostraron el comportamiento molecular de las antocianinas a nivel celular

y demostraron de manera convincente que los extractos de frutas, como las granadas y las moras, suprimieron significativamente la producción de mediadores inflamatorios en condrocitos humanos (Ahmed *et al.*, 2005; Rasheed *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2019).

Las antocianinas y las agliconas tienen algunas bioactividades en común, pero existen marcadas diferencias según la sustitución del anillo B, como se demostró para Df, Cn, peonidina (Pn) y glicósidos en estos ensayos (**Tabla 8.1**).

Estas pruebas respaldaron que las antocianinas son agentes antiinflamatorios y antioxidantes efectivos. Sin embargo, se debe evaluar la ruta metabólica y la biodisponibilidad de estos compuestos dietarios para conocer más a fondo la posible administración en pacientes. Df y Cn, dos de las antocianidinas más comunes que se encuentran en diferentes matrices alimentarias, no demostraron citotoxicidad a concentraciones inferiores a 50 μM durante 24 h y 100 μM durante 48 h respectivamente. Estos estudios son importantes para comprender los mecanismos condroprotectores y las posibles aplicaciones de las antocianinas y sus agliconas para la prevención y el tratamiento de la artrosis.

Tabla 8.1. Ensayos de antocianinas, metabolitos y extractos de alimentos en condrocitos humanos y cultivos de células relacionados.

Compuestos (Matriz)	Estudios <i>in vitro</i> en células humanas [y estudios <i>in vivo</i>]	Mecanismo molecular	Hallazgos	Resultados	Ref.
Antocianinas y elagitaninos. Extracto de frutos de granada (PFE: <i>pomegranate fruit extract</i>) (<i>Punica granatum</i> L.)	Explantos de cartílago <i>in vitro</i> . Condrocitos humanos (HC) con OA.	IL-1 β induce la expresión de las MMPs involucradas en la resorción del cartílago y la degradación de las articulaciones afectadas por OA. La actividad de unión al ADN de NF- κ B en los HC afectados por OA está relacionada con la producción de citoquinas en las sinovias de los pacientes con OA. Los factores de transcripción NF- κ B participan en la inflamación, la degradación del cartílago, la proliferación celular, la angiogénesis y la formación del pannus.	- PFE inhibe la degradación de proteoglicanos inducida <i>in vitro</i> por IL-1 β en explantos de cartílago. - A nivel celular, PFE (6,25-25 mg/L) inhibe la expresión inducida por IL-1 β de las proteínas MMP-1, -3 y -13 en el medio. - Dosis bajas de PFE inhiben la fosforilación inducida por IL-1 β de p38-MAPK, pero no la de JNK o ERK. PFE bloquea la actividad de p38-MAPK. - PFE también inhibe la fosforilación inducida por IL-1 β de I κ B α y la actividad de unión al ADN del factor de transcripción NF- κ B en HC con OA.	Los componentes de PFE protegen el cartílago articular y contribuyen a mejorar la patogénesis de la OA. PFE inhibe la degradación del cartílago en la OA y contribuye a mantener la integridad y la función de las articulaciones.	Ahmed <i>et al.</i> , 2005.
Antocianinas y elagitaninos. Extracto de frutos de granada (PFE).	HC con OA.	p38-MAPK es una vía principal de transducción de señales en la OA. La activación de p38-MAPK en los HC de la OA está mediada preferentemente por la activación de MKK3.	- PFE inhibe la activación inducida por IL-1 β de MKK3, p38 α -MAPK y el factor de transcripción RUNX-2 en HC con OA. - Los HC con OA expresan las isoformas p38-MAPK p38 α , - γ y - δ , pero no p38 β . - IL-1 β aumenta la fosforilación de las isoformas p38 α -MAPK y p38 γ -MAPK, pero no de la isoforma p38 δ -MAPK en HC con OA. - PFE inhibe la activación inducida por IL-1 β de MKK3, la isoforma p38 α -MAPK y la actividad de unión al ADN del factor de transcripción RUNX-2.	PFE bloquea la activación inducida por IL-1 β de MKK3, las isoformas p38-MAPK y el factor de transcripción RUNX-2 en condrocitos con OA humana primaria.	Rasheed <i>et al.</i> , 2010.
Df	HC con OA.	La articulación afectada por OA muestra una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β . IL-1 β induce la activación de NF- κ B, la expresión de COX-2 y la producción de PGE ₂ .	- Df inhibe la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β y la producción de PGE ₂ en HC. - Df también inhibe la fosforilación de IRAK-1 ^{Ser376} mediada por IL-1 β ; la fosforilación de IKK α / β ; la expresión de IKK β ; la degradación de I κ B α ; la activación y translocación nuclear de NF- κ B/p65. - No se observa fosforilación de la quinasa 1 activada por TGF- β , pero NIK es fosforilada y bloqueada por Df en HC tratados con IL-1 β .	Df contribuye a nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y el tratamiento de OA.	Haseeb <i>et al.</i> , 2013.
Extracto etanólico de porotos rojos (RBE: <i>red bean ethanolic extract</i>) (<i>Phaseolus radiatus</i> L. var. <i>aurea</i>)	Línea de macrófagos RAW264.7	Cuando son estimulados por patógenos o moléculas derivadas del huésped, como LPS e IFN- γ , los macrófagos secretan mediadores inflamatorios y citoquinas.	- RBE a 50–200 μ g/mL suprime significativamente las respuestas inflamatorias en macrófagos estimulados con LPS a través de la disminución del NO celular y la subregulación de las expresiones genéticas de iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6 de manera dependiente de la dosis.	Los porotos rojos ejercen una respuesta antiinflamatoria y muestran potencial como agente promotor de la salud.	Chao <i>et al.</i> , 2015.
Hojas de morera (MBL: <i>mulberry leaves</i>) (<i>Morus alba</i> L.).	HC SW1353 (ATCC: HTB-94).	La citoquina proinflamatoria IL-1 β desempeña un papel importante en la patogénesis de la OA al activar varios mediadores que dan lugar a la	- MBL disminuyen significativamente la liberación de MMP-1 y MMP-13 inducida por IL-1 β , asociada con la inhibición de la expresión de ARNm de MMP-1 y MMP-13 y de proteína, de manera dependiente de la dosis.	MBL ofrece condroprotección contra la degradación de la matriz de colágeno en el cartílago con OA.	Jeong <i>et al.</i> , 2016.

<p>Compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas.</p>		<p>degradación del cartílago.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - MBL también atenúan la producción de NO y PGE₂ inducida por IL-1β, y disminuyen la expresión de iNOS y COX-2. - MBL inhiben fuertemente la translocación nuclear de NF-κB inducida por IL-1β, que se correlaciona con los efectos inhibidores de MBL sobre la degradación de κB; la fosforilación de p38 MAPK es restaurada selectivamente por MBL tras la estimulación con IL-1β. 		
<p>Mezcla de antocianinas de <i>p</i>-cumaroilo de Jayoung (JCA: <i>Jayoung p-coumaroyl anthocyanins</i>) (peonanina, malvanina y pelanina) <i>Solanum tuberosum</i> L. cv Jayoung</p>	<p>Línea de macrófagos RAW264.7</p>	<p>LPS es una endotoxina bacteriana que activa a los macrófagos y conduce a un aumento de citoquinas proinflamatorias y enzimas relacionadas mediante la activación de varias vías de señalización celular, incluidas MAPKs, PI3K/Akt (serina/treonina proteína quinasa B), NF-κB, AP-1 y proteínas STAT.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - JCA inhibe varios genes proinflamatorios, como <i>iNOS</i>, <i>COX-2</i>, <i>TNF-α</i> e <i>IL-6</i>, en macrófagos RAW264.7 inducidos por LPS. - JCA inhibe la actividad transcripcional inducida por LPS de NF-κB de una manera dependiente de la concentración. - JCA suprime la producción y la expresión de ARNm de TNF-α e IL-6. 	<p>JCA es un posible tratamiento opcional para enfermedades inflamatorias.</p>	<p>Lee <i>et al.</i>, 2017.</p>
<p>Cn</p>	<p>Células madre mesenquimales (MSCs)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Las MSCs se pueden diferenciar en precondrocitos, que se utilizan como células madre en la ingeniería de tejidos. En el cartílago regenerado, los condrocitos derivados de MSCs apenas pueden mantener la homeostasis y muestran un fenotipo hipertrófico. - Efectos de Cn sobre la diferenciación condrogénica y la subsiguiente diferenciación hipertrófica de MSCs con el fin de lograr enfoques para inhibir la hipertrofia de los condrocitos. - Expresión de genes marcadores condrogénicos e hipertróficos debido a Cn mediante RT-PCR, Western blot, tinción con azul Alcian e inmunocitoquímica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cn inhibe tanto los genes <i>SOX9</i> y <i>Col2A1</i> relacionados con la condrogénesis, así como los genes <i>runx2</i> y <i>Col10A1</i> marcadores hipertróficos. - Cn promueve la expresión de Nrf2 y p62, y suprime la expresión de LC3B durante la etapa condrogénica de las MSCs. - Cn inactiva la fosforilación de IκBα y la proteína LC3B relacionada con el autofagosoma durante la etapa hipertrófica de los condrocitos. - La rapamicina, un activador de la autofagia, suprime el efecto inhibidor de Cn sobre la diferenciación condrogénica e hipertrófica de las MSCs. 	<p>Cn inhibe la diferenciación condrogénica e hipertrófica de las MSCs al suprimir la autofagia.</p> <p>Cn es un agente adecuado para mantener las funciones de los condrocitos maduros.</p>	<p>Cao <i>et al.</i>, 2018.</p>
<p>Cn</p>	<ul style="list-style-type: none"> - HC con OA - [Modelos de OA en ratones] 	<p>La inflamación es el factor de riesgo más importante para el inicio y la progresión de OA.</p> <p>Cn puede ejercer efectos protectores durante el desarrollo de OA mediante la activación de Sirt6, que a su vez reprime la vía de señalización de NF-κB.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - [Cn] <100 μM no es citotóxica para los condrocitos humanos antes de las 48 hs. Por lo tanto, se utilizan [Cn]: 12,5, 25 y 50 μM. En HC con OA: Cn inhibe fuertemente la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por IL-1β (NO, PGE₂, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6) de manera dependiente de la dosis. - Cn sobre-regula la expresión de proteínas de colágeno II y agrecano, y subregula la expresión de los principales contribuyentes a la degeneración de la matriz extracelular (MMP13, ADAMTS5) de manera dependiente de la dosis. 	<p>Cn alivia la degradación de la matriz extracelular inducida por IL-1β y la respuesta inflamatoria en HC con OA a través de la inhibición de NF-κB mediada por Sirt6.</p> <p>El tratamiento con Cn disminuye la progresión de OA en un modelo de ratones inducidos quirúrgicamente.</p>	<p>Jiang <i>et al.</i>, 2019.</p>

Extracto de frutos de morera (MBF: <i>mulberry fruit extract</i>) (frutos de <i>Morus alba</i> L.). Anthocianinas y flavanoles.	-Línea de macrófagos RAW264.7	Los LPSs son potentes inductores de la respuesta inflamatoria, activando las células de la respuesta inmune y liberando citoquinas proinflamatorias.	- MBF inhibe al mediador inflamatorio como: la liberación de NO y la expresión de ARNm de NOS2 en células RAW264.7 inducidas por LPS. - MBF suprime las expresiones de ARNm y de proteína de PTGS2. - MBF reduce la secreción de citoquinas proinflamatorias, inducida por LPS, como IL-6 y TNF- α .	MBF muestra efectos antiinflamatorios al inhibir varios mediadores (liberación de NO, NOS2, PTGS2) y citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α).	Jung <i>et al.</i> , 2019.
Tres cultivares de arroz morado tailandés. Cn-3-O-Glu y Pn-3-O-Glu. Cn, Pn y PA son metabolitos.	-Cartilago articular porcino inducido por IL-1 β . - HC con OA, inducidos por IL-1 β	IL-1 β , TNF- α , ADAMTS-4 y -5, junto con la regulación positiva de mediadores proinflamatorios adicionales, conducen a la autodestrucción gradual del cartilago, junto con una disminución de la diferenciación condrogénica y la expresión de quinasas y factores de transcripción nuclear, como NF- κ B y MAPKs.	- Cn-3-O-Glu y Pn-3-O-Glu inhiben la degradación del cartilago porcino. - PA muestra potencial condroprotector al disminuir la degradación de GAG y de colágeno en explantos de cartilago porcino inducidos por IL-1 β /oncostatina M en condiciones a largo plazo. - Cn-3-O-Glu, Pn-3-O-Glu y sus metabolitos disminuyen la inducción de MMPs causada por CH estimulados por IL-1 β . - Cn-3-O-Glu, Pn-3-O-Glu y sus metabolitos inhiben significativamente la degradación de I κ B α , el nivel de fosfo-p65 y la vía ERK/MAPK. - PA aumenta la fosforilación de JNK en CH estimulados por IL-1 β	Las antocianinas del salvado de arroz integral y morado muestran efectos beneficiosos sobre la condroprotección o efectos sintomáticos; posibles candidatos para detener o retrasar la progresión de la enfermedad articular inflamatoria.	Wongwichai <i>et al.</i> , 2019.
Moléculas pequeñas de hierbas. 34 compuestos de la medicina tradicional china (TCMC: <i>Traditional Chinese Medicine compounds</i>)	HC con OA	Una terapia biológica eficaz contra OA debe contrarrestar el catabolismo elevado y aumentar el anabolismo. Es necesario inhibir las citoquinas proinflamatorias que abundan en las articulaciones afectadas por OA.	- De los 34 TCMC, el ácido vainillínico, las epimedinas A y C, el 2''-O-ramnosil-icariósido II, la icariína, la psoralidina, el aldehído protocatéquico, el ácido 4-hidroxibenzoico y el 5-hidroximetilfurfural muestran los efectos anabólicos más fuertes. - Después de la inducción de la inflamación, se sobre-regulan los genes proinflamatorios y catabólicos y disminuye la relación GAG/ADN. - Después de un tratamiento de 2 semanas con TCMC, la relación GAG/ADN se restablece en comparación con el grupo control negativo.	TCMC y sus combinaciones pueden considerarse fármacos antiinflamatorios y anabólicos para el tratamiento de la OA temprana.	Ziadlou <i>et al.</i> , 2019.
Mv, Cn y Df	hMSCs	- Las hMSCs son células madre adultas multipotentes responsables de la regeneración de grasa, hueso y cartilago (diferenciación de las MSCs derivadas del tejido adiposo en adipocitos, osteocitos y condrocitos). - Los efectos de Mv, Cn y Df en la diferenciación de las MSCs en condiciones de cultivo celular están respaldados por la tinción citoquímica y la expresión de genes y proteínas específicos del tejido. Liraglutida se usa como fármaco de referencia.	- Df inhibe la adipogénesis de las MSCs mediante la subregulación de los genes <i>FABP4</i> y <i>adiponectina</i> . - Mv induce osteogénesis; depósitos de calcio significativamente altos y sobre-regulación de la expresión de <i>BMP-2</i> y <i>runx-2</i> específica de osteocitos; también induce la secreción de BMP-2. - Cn y Df estimulan la condrogénesis mediante la sobre-regulación de <i>Col2A1</i> y <i>agrecano</i> ; aumento de GAG.	- Mv, Cn y Df inducen osteogénesis y condrogénesis, mientras que Df inhibe la adipogénesis. - Efectos positivos de las antocianidinas en la regeneración tisular.	Saulite <i>et al.</i> , 2019.
Df	- Células C28/I2 de CH (SCC043)	El estrés oxidativo participa en la patogénesis de OA y, por lo tanto, las enzimas antioxidantes disminuyen en los pacientes con OA.	- [Df] < 50 μ M durante 24 hs no afecta la viabilidad de los HC. - Df inhibe la apoptosis inducida por ROS al disminuir significativamente los marcadores de apoptosis c-caspasa-3 y c-PARP, mientras aumenta el marcador antiapoptótico Bcl-XL y las vías de respuesta antioxidante NF- κ B y Nrf2. - Df activa la autofagia citoprotectora para proteger a los HC durante el estrés oxidativo. La activación de la autofagia con el inductor de autofagia rapamicina también inhibe la muerte celular inducida por ROS y disminuye las proteínas proapoptóticas, pero aumenta la proteína antiapoptótica (Bcl-X _L , NF- κ B, Nrf2).	Df protege a los condrocitos del estrés oxidativo relacionado con la edad y otros factores para el tratamiento de OA. Df desempeña un papel fundamental en la prevención del desarrollo y la progresión de OA.	Lee <i>et al.</i> , 2020.

<p>Comparación del extracto de frutas de granada (PFE), insaponificable de palta/soja (ASU: <i>avocado/soybean unsaponifiable</i>) y PFE+ASU (1:1).</p>	<p>Células madre derivadas de tejido adiposo humano (hASCs: <i>human adipose stem cells</i>)</p>	<p>- Efecto de PFE, ASU y PFE+ASU en la condrogénesis de hASCs. - Ensayo MTT para evaluación de la viabilidad celular, PCR en tiempo real para expresión de los genes del cartílago y azul de toluidina, safranina O e inmunohistoquímica para tinción de constructos.</p>	<p>- La viabilidad celular, la expresión génica del cartílago, la densidad de tinción de la matriz y los niveles de proteína de colágeno II son significativamente más altos en las muestras de PFE que en las de ASU y PFE+ASU. - Las evaluaciones histológicas revelan significativamente más centros condrogénicos en las muestras de PFE en comparación con los otros grupos.</p>	<p>PFE fue el mejor factor de inducción en comparación con ASU y PFE+ASU para estudios condrogénicos y aplicaciones en ingeniería de tejidos de cartílago.</p>	<p>Teimourinejad <i>et al.</i>, 2020.</p>
<p>Antocianinas del maíz morado (<i>Zea mays</i> L.) Cn-3-O-Glu, Pg-3-O-Glu y Pn-3-O-Glu. Antocianinas menores: Mv-3-O-Glu, Pg-3-O-(6"-malonyl)Glu y Pn-3-O-(6"-malonyl)Glu.</p>	<p>-HC - Cartílago articular porcino</p>	<p>- Estudio de los efectos condroprotectores del extracto de maíz morado sobre la degradación del cartílago inducida por AGEs. - AGEs están asociados con la diabetes mellitus y contribuyen a OA mediante la degradación del cartílago articular, mediada por la inflamación. - Otra causa de OA inducida por AGEs: La interacción de AGEs con RAGEs en las membranas celulares de los condrocitos estimula la inflamación vía la activación de NF-κB y MAPK, seguida de sobre-regulación de las citoquinas proinflamatorias. A su vez, las citoquinas proinflamatorias inducen a HC a secretar MMPs, que degradan la matriz extracelular del cartílago y contribuyen a OA.</p>	<p>- Las antocianinas tienen propiedades antidiabéticas y muestran efectos antiinflamatorios consecuentes. - Disminución de GAG liberados de explantos de cartílago inducidos por AGEs, correspondiente a una disminución de la pérdida de ácido urónico de la matriz del cartílago. - El efecto antiinflamatorio de las antocianinas del maíz morado y el metabolito PA sobre los HC articulares inducidos por AGE se produce vía la inactivación de las vías de señalización NFκB y MAPK.</p>	<p>Las antocianinas del maíz morado y PA disminuyen la inflamación mediada por AGEs y la degradación del cartílago mediada por la diabetes.</p>	<p>Chuntakaruk <i>et al.</i>, 2021.</p>

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Animales Experimentales de las Universidades y Centros de Investigación involucrados. La recolección de tejido de artrosis humana y los experimentos que involucraron artrosis humana fueron aprobados por los Comités de Ética y siguieron las pautas de la Declaración de Helsinki. Los participantes humanos firmaron consentimientos informados por escrito, después de recibir información detallada de los protocolos de investigación.

Abreviaturas: AGEs (*advanced glycation end products*): productos finales de glicación avanzada; Akt, serine/threonine protein kinase B); proteína-quinasa B de serina/treonina; Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*): linfoma de células B extra grandes; BMP-2 (*bone morphogenic protein 2*): proteína morfogénica ósea 2; c-caspase-3 (*cleaved-cysteiny aspartate specific proteinase-3*): proteínasa-3 específica de aspartato de cisteinilo escindido; Col2A1: colágeno tipo II alfa 1; Col10A1 (*collagen type X alpha 1 chain*): cadena alfa 1 de colágeno tipo X; c-PARP [*cleaved poly(ADP-ribose) polymerase N-acetylcysteine*]: poli(ADP-ribosa) polimerasa N-acetilcisteína escindida; [Cn]: concentración de cianidina; Cn-3-O-Glu: cianidina-3-O-glucósido; [Df]: concentración de delfinidina; ECM (*extracellular matrix*): matriz extracelular; FABP4 (*fatty acid binding protein 4*): proteína de unión a ácidos grasos 4; GAG: glicosaminoglicanos; hASCs (*human adipose-derived stem cells*): células madre derivadas de tejido adiposo humano; HC (*human condrocytes*): condrocitos humanos; hMSCs (*human mesenchymal stem cells*): células madre mesenquimales humanas; κBα: inhibitor of kappaBα; IRAK-1 (Ser376) [*interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (Serine 376)*]: quinasa-1 asociada al receptor de interleuquina-1 (serina 376); LC3B (*light chain 3b microtubule-associated proteins 1a/1b*): cadena ligera 3b de las proteínas 1a/1b asociadas a microtúbulos; MAPK (*mitogen-activated protein kinase*): proteína-quinasa activada por mitógeno; MBL (*mulberry leaves*): hojas de morera; MMPs: metaloproteinasas; MSCs (*mesenchymal stem cells*): células madre mesenquimales; Mv: malvidina; NF-κB (*nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*): factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas; Nrf2 (*nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2*): factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2; OA: osteoartritis; PA (*protocatechuic acid*): ácido protocatequico; PFE (*pomegranate fruit extract*): extracto de frutos de granada; Pg-3-O-Glu: pelargonidina-3-O-glucósido; PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*): fosfoinosítido 3-quinasa; Pn: peonidina; Pn-3-O-Glu: peonidina-3-O-glucósido; RAGEs (*receptor for advanced glycation end products*): receptor para productos finales de glicación avanzada; PCR en tiempo real (*real-time PCR, real-time polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa; runx2 (*runt-related transcription factor 2*): factor de transcripción 2 relacionado con runt; SOX9 (*SRY-box transcription factor 9*): factor de transcripción 9 SRY-box; proteínas STAT (*STAT proteins; signal transducer and activator of transcription protein family*): transductor de señales y activador de la familia de proteínas de transcripción.

8.3. Efectos de los alimentos ricos en antocianinas en pacientes con artrosis en ensayos clínicos en humanos

Dado que los ensayos clínicos en pacientes con artrosis son muy heterogéneos, en esta Tesis se seleccionaron diecinueve artículos de investigación consistentes para su análisis crítico. Todos estos estudios se refieren a la artrosis; no se incluyeron otras artritis como la artritis reumatoide y la gota. Catorce ensayos son estudios de intervención y cinco son estudios observacionales (**Tabla 8.2**).

Se utilizaron frutos de escaramujo o *rosehip* [frutos pomáceos de los arbustos del género *Rosa*, como la rosa mosqueta (*Rosa eglanteria*) y el rosal silvestre (*Rosa canina*)], cáscaras de maracuyá o mburucuyá morado, cerezas ácidas, granadas, frutillas y arándanos. La mayoría de ellos son ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego, cruzados y controlados con placebo a excepción de algunos estudios piloto, todos los cuales se analizan en la **Tabla 8.2**. Los participantes informaron sobre el dolor, la rigidez, la función articular y el bienestar general después de responder cuestionarios específicos sobre la artrosis. En los últimos años, se ha incluido una evaluación adicional de los marcadores inflamatorios séricos, como en el caso de las cerezas ácidas (Kuehl *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2013).

Todos los ensayos clínicos sobre el escaramujo y la artrosis demostraron con éxito un alivio del dolor y una mejoría física en los pacientes con artrosis según el índice de osteoartritis Western Ontario McMaster (WOMAC, *Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index*) y la Escala de resultados de lesiones de rodilla y osteoartritis (KOOS, *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*) (Warholm *et al.*, 2003; Rein *et al.*, 2004; Winther *et al.*, 2005; Chrubasik *et al.*, 2008; Christensen *et al.*, 2014; Chrubasik-Hausmann *et al.*, 2014; Marstrand *et al.*, 2017) (**Tabla 8.2**). Una limitación general es la falta de análisis de antocianinas de las bebidas y de análisis bioquímicos de los pacientes.

El extracto de cáscaras del fruto de maracuyá o mburucuyá morado como suplemento dietario mostró actividad antioxidante y fuerte acción antioxidante en corto tiempo en la dosis adecuada (Farid *et al.*, 2010) (**Tabla 8.2**).

El jugo de cerezas ácidas es conocido como una bebida antioxidante debido a las antocianinas, como: Cn-3-*O*-glucosilrutinosido y Cn-3-*O*-rutinosido como componentes principales, y Cn-3-*O*-soforósido y Cn-3-*O*-glucósido como componentes secundarios (Damar & Ekşi, 2012; Schumacher *et al.*, 2013). En el ensayo, la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP, *high-sensitivity C-reactive protein*) sérica fue seleccionada con éxito como marcador de inflamación y puede asociarse a la progresión de la artrosis (Pearle *et al.*, 2007). Los niveles séricos de hsCRP disminuyeron significativamente durante el tratamiento con cerezas, lo que se asoció con mejores puntajes WOMAC (Schumacher *et al.*, 2013). Por lo tanto, la disminución de los síntomas de artrosis estuvo directamente relacionada con el efecto antiinflamatorio del jugo de cerezas.

Se conocen varios ensayos clínicos con jugos de cerezas, en los cuales se miden algunos biomarcadores inflamatorios séricos [proteína C reactiva, CRP, IL-6, IL-10 y TNF- α], junto con las puntuaciones de WOMAC y la escala analógica visual (VAS, *visual analog*

scale) (Kuehl *et al.*, 2012) (**Tabla 8.2**). Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en CRP en el grupo de cerezas de acuerdo con la actividad antiinflamatoria de sus antocianinas (Kuehl *et al.*, 2012).

La granada es una de las frutas más antiguas asociadas a leyendas, influencias socioculturales y usos medicinales ancestrales (Viuda-Martos *et al.*, 2010), originaria de Oriente Medio, desde Irán hasta la India expandida hasta el área mediterránea. Actualmente, la granada se considera una fruta funcional. El jugo de granada contiene 3-*O*-glucósidos y 3,5-*O*-diglucósidos de Cn, Df y pelargonidina (Pg), que son antioxidantes fuertes como hemos visto en esta Tesis (Di Stefano *et al.*, 2019; Gardeli *et al.*, 2019). Los taninos hidrolizables (elagitaninos llamados punicalaginas), las antocianinas poliméricas y los ácidos fenólicos también están presentes en los frutos (Gardeli *et al.*, 2019).

Los ensayos clínicos realizados con frutos de granada suelen ser estudios a corto plazo, en los que se midió el dolor, la rigidez y el rendimiento físico. Se hizo un seguimiento de algunos de los marcadores de inflamación y degradación del cartílago. El alivio de la rigidez articular, el dolor y el comportamiento funcional se ha atribuido durante mucho tiempo a los elagitaninos, pero los estudios actuales demostraron la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las antocianinas de la granada y los complejos antocianina-tanino (**Tabla 8.2**).

El jugo de granada inhibió la expresión de MMPs (MMP-1, -3 y -13) al subregular la activación de MAPKs (fosforilación de p38-MAPK e I κ B α), lo que respalda los ensayos con condrocitos (Ahmed *et al.*, 2005; Rasheed *et al.*, 2010) (**Tabla 8.1**). Los resultados fueron prometedores y mostraron que la granada mejoró la función física en las actividades diarias y disminuyó significativamente la rigidez. Dado que las MMPs participan en la resorción del cartílago y la degradación de las articulaciones en la artrosis, la protección del cartílago articular por la granada se debe a su inhibición. Este jugo también inhibió la actividad de unión al ADN de NF- κ B, que está relacionada con la producción de citoquinas en la sinovia de los pacientes con artrosis. Como los factores de transcripción NF- κ B están involucrados en la inflamación, la degradación del cartílago, la proliferación celular y la angiogénesis, el bloqueo de NF- κ B resultó en una mejora de la artrosis (Ahmed *et al.*, 2005; Ghoochani *et al.*, 2016).

Se estudiaron los efectos de la suplementación con frutillas en pacientes con artrosis de rodilla. Las variedades de frutillas contienen antocianinas, como Pg-3-*O*-glucósido (77-90%), Pg-3-*O*-rutinosido (6-11%) y Cn-3-*O*-glucósido (3-10%) (Lopes da Silva *et al.*, 2007). El consumo de frutillas disminuyó los marcadores séricos de inflamación sistémica y mejoró la función de la rodilla en pacientes con artrosis sintomática de rodilla (Schell *et al.*, 2017; Basu *et al.*, 2018).

Los efectos de los arándanos y el placebo sobre el peso y el índice de masa corporal (IMC), la presión arterial sistólica y diastólica, los valores de WOMAC total y las subpuntuaciones de dolor, rigidez y dificultad para realizar actividades diarias, así como las citoquinas inflamatorias plasmáticas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), las citoquinas antiinflamatorias (IL-10 e IL-13), las MMPs (MMP-3 y MMP-13) y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*).

Los hallazgos de este ensayo sugirieron que los arándanos disminuyeron significativamente el dolor, la rigidez y la dificultad para realizar actividades diarias (WOMAC), como los valores de presión arterial sistólica y diastólica, mostrando resultados muy prometedores (Du *et al.*, 2019).

Se encontró un aumento significativo en el biomarcador antiinflamatorio IL-13 y una tendencia decreciente en los niveles plasmáticos de MCP-1 en el grupo de arándanos. Como se sabe, MCP-1 aumenta en enfermedades inflamatorias y participa en el reclutamiento de leucocitos hacia los focos inflamatorios. Estos hallazgos sobre IL-13 y MCP-1 están demostrando la actividad antiinflamatoria de los frutos de arándanos (Du *et al.*, 2019).

Por otro lado, se realizaron estudios observacionales como un estudio de cohorte longitudinal ($n = 4330$ sujetos norteamericanos con alto riesgo o con artrosis de rodilla) con un período de seguimiento medio de 4 años, que comparó la dieta occidental con la dieta mediterránea, destacando y mostrando las ventajas significativas de esta última (Veronese *et al.*, 2019) (**Tabla 8.2**). Otro estudio de cohorte longitudinal reciente de la investigación de la iniciativa artrosis dio cuenta de 4976 sujetos con artrosis de rodilla seguidos durante unos 72 meses, mostrando estadísticamente que un patrón dietario saludable se asoció con una disminución de la progresión de la artrosis de rodilla (Xu *et al.*, 2020) (**Tabla 8.2**).

Hay tres estudios observacionales restantes sobre la artrosis en América Latina (Reginato *et al.*, 2015). Uno de ellos incluyó 1210 pacientes con artrosis de rodilla de Argentina, Brasil y Méjico, que mostró que las variables demográficas, clínicas y terapéuticas estaban significativamente influenciadas por el país de origen y el sistema de atención médica (Burgos Vargas *et al.*, 2014) (**Tabla 8.2**). Todos estos estudios observacionales bien diseñados caracterizados por análisis estadísticos adecuados se incluyeron para resaltar la relevancia de conocer las características de los pacientes con artrosis y la importancia del patrón de dieta, la medicación para aliviar el dolor y la disponibilidad de atención médica. Este conocimiento juega un papel importante al abordar un ensayo clínico sobre artrosis.

Tabla 8.2. Ensayos clínicos en humanos sobre los efectos de los alimentos ricos en antocianinas en pacientes con artrosis.

Matriz alimentaria	Diseño del estudio. Tipo de ensayo. Duración. Dosis.	Pacientes con artrosis: n, género, edad	Principales hallazgos	Ref.
Estudios de intervención				
Polvo estandarizado de escaramujo o rosa mosqueta (PEE) (<i>Rosa canina</i> L.)	Ensayo RPCT, doble ciego y de un solo centro. 4-meses 2 x 5 cápsulas/día, 0,5 g de PEE. No se informa el contenido de antocianinas.	100 pacientes con diagnóstico de OA de cadera o rodilla. (65F/35M) 65,2 ± 11,1 años de edad.	- La movilidad de la articulación de la cadera mejora significativamente en el grupo PEE vs PLA. - El dolor disminuye significativamente en el grupo PEE vs PLA. - El grupo PEE estandarizado disminuye los síntomas de OA. El grupo PEE mejora la flexión de la cadera y disminuye el dolor en pacientes con OA. (64,6 % de los pacientes informaron cierta disminución del dolor durante el tratamiento).	Warholm <i>et al.</i> , 2003.
Polvo comercial Hyben Vital (PEE)	Ensayo RPCT cruzado, doble ciego. 6 meses 14 días 5 g/día (5 cápsulas de 0,5 g por la mañana y por la noche). No se informa el contenido de antocianinas.	112 pacientes con OA primaria en cadera, rodillas, manos, hombros o cuello, o combinadas. (F/M) 67,17 ± 11,6 años de edad. Sobrepeso	- Los pacientes muestran cambios en el dolor y la rigidez de las articulaciones después de cada tratamiento. - El grupo A (PLA primero) muestra una mejora significativamente mayor con Hyben Vital que con PLA, en lo que respecta a dolor y rigidez. Los resultados de los dos grupos después del tratamiento cruzado muestran un fuerte efecto de arrastre de Hyben Vital. - Resultados similares para el bienestar general. - Hyben Vital disminuye los síntomas de OA.	Rein <i>et al.</i> , 2004.
Hyben Vital (PEE)	RPCT cruzado, doble ciego. 3 meses cada tratamiento 5 g/día No se informa el contenido de antocianinas.	94 pacientes con OA de cadera o rodillas. (54F/40M) F 38-92 años de edad; M 48-75 años de edad.	- El tratamiento con PEE produce una disminución significativa del dolor según WOMAC vs PLA, después de 3 semanas de tratamiento. - El consumo de medicación de rescate disminuye significativamente debido al tratamiento. - No hay cambios en la discapacidad, la rigidez y la evaluación global de la gravedad de la enfermedad según WOMAC después de 3 semanas, pero sí una disminución significativa después de 3 meses de tratamiento. - El tratamiento con Hyben Vital alivia los síntomas de OA.	Winther <i>et al.</i> , 2005.
PEE	Vigilancia piloto. 1 año 3 mg de galactolípidos/día.	152 pacientes con dolor crónico agudo, 124 con dolor lumbar inespecífico, 20 con dolor lumbar inespecífico superpuesto al dolor de OA (grupo rodilla-cadera) y 8 con dolor lumbar específico. Sólo 77 pacientes completaron la vigilancia.	- El análisis multivariable sugiere una mejora general apreciable durante la vigilancia, independientemente del grupo, como se muestra en el ANOVA de medidas repetidas. - Los análisis de regresión múltiple indican que los cambios porcentuales con respecto al valor inicial son mayores en pacientes con mayor grado de dolor y discapacidad.	Chrubasik <i>et al.</i> , 2008.
Extracto de cáscara de maracuyá o mburucuyá morado (ECM) (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	RPCT de doble ciego con diseño de grupo paralelo. 2-meses Pastillas de ECM (150 mg/día). Informe cualitativo (no cuantitativo) sobre antocianinas y otros flavonoides.	40 pacientes con OA de rodilla (33 completaron el estudio). (8M/25F) 25-69 años de edad.	- Mejora significativa del grupo ECM en la puntuación total de WOMAC y en la subescala WOMAC de función física después de 30 días y dolor después de 2 meses. - En el grupo ECM, disminución del dolor (18,6 %), de la rigidez (18 %), de la función física (19,6 %) y de las puntuaciones compuestas de WOMAC (19,2 %) después de 2 meses. - El ECM alivia sustancialmente los síntomas de OA, probablemente debido a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.	Farid <i>et al.</i> , 2010.
Jugo de cerezas ácidas (<i>Prunus cerasus</i> L. cultivar Montmorency)	RPCT de doble ciego. Protocolo de 3 semanas. 6-8 meses 2 botellas/día, 1 por la mañana y 1 por la noche. 40 mg de	20 pacientes con OA, no diabéticos, con OA al menos moderada. (F) 30-70 años de edad. Obesidad clase I y sobrepeso	- Disminución significativa del biomarcador inflamatorio sérico CRP después de la intervención con jugo de cerezas ácidas. - Alivio del dolor y mejora de la discapacidad funcional.	Kuehl <i>et al.</i> , 2012.

	antocianinas calculadas como equiv de Cn-3-O-Glu.			
Jugo de cerezas ácidas	Estudio cruzado, aleatorizado, doble ciego. 14-semanas 2 botellas/día (mañana y tarde); al menos 30 mg de antocianinas como equiv de Cn-3-O-Glu.	58 pacientes con OA no diabéticos con OA de rodilla leve y moderada. (44M/14F) 18-80 años de edad. Sobrepeso y obesidad	- Mejora significativa del dolor y la función en la escala WOMAC. - Las puntuaciones WOMAC (alivio de los síntomas) disminuyen significativamente después de la ingesta del jugo de cerezas, pero no después de la ingesta de PLA. - El jugo de cerezas disminuye significativamente hsCRP vs PLA debido a la mejora de las puntuaciones WOMAC. - El tiempo de caminata, el urato sérico y la creatinina no se ven afectados por los tratamientos.	Schumacher <i>et al.</i> , 2013.
Complemento dietario: polvo de escaramujo o rosa mosqueta (PEE).	Ensayo controlado, aleatorizado, exploratorio, paralelo y de un solo centro (fase 2). 12-semanas A: 4500 mg de PEE original (pulpa + semillas) + 80 mg de vit C una vez al día (6 cápsulas/día), B: 4500 mg de PEE mejorado (sin semillas) + 80 mg de vit C una vez al día (6 cápsulas/día) y C: 2250 mg de PEE mejorado (media dosis) + 80 mg de vit C una vez al día (3 cápsulas/día).	259 pacientes con OA de rodilla. Se asignaron al azar 150 pacientes con OA de rodilla. (M/F) ≥ 40 años de edad. Sobrepeso y obesidad clase I.	- Diversas preparaciones y dosis de PEE en pacientes con OA de rodilla todas disminuyen el dolor al caminar sobre una superficie plana. El cambio en el dolor al caminar no muestra un efecto significativo del tratamiento a lo largo del tiempo, pero sí una posible interacción estadística entre el tratamiento y el tiempo, que es la respuesta a varias formulaciones de PEE a lo largo del tiempo. - Los síntomas de KOOS mejoran significativamente con PEE mejorado (3 cápsulas/día) vs PEE original. - Los cambios en la calidad de vida de los participantes (componente mental) son estadísticamente mejores en el grupo de PEE mejorado (6 cápsulas/día) vs RHP original. - El PEE mejorado es al menos tan bueno como el PEE original, incluso si se toman 3 cápsulas/día en pacientes con OA sintomática. - Este ensayo contribuye a la decisión de realizar un ensayo subsiguiente tipo fase III.	Christensen <i>et al.</i> , 2014.
Frutos de escaramujo o <i>Rosa canina</i> L. (PEE con cáscara).	Estudio piloto. 3-meses 20 g/día de PEE con cáscara.	52 pacientes que sufrieron exacerbaciones agudas de dolor lumbar o dolor de rodilla.	- No hubo diferencias en ninguna variable genérica o específica de la enfermedad de los resultados entre los pacientes que consumieron PEE con cáscara y los que consumieron el polvo de pseudofruta Litozin. - Las fracciones lipofílicas de PEE con cáscara y la pseudo-fruta inhiben la expresión de citoquinas. PEE con cáscara puede ser el mejor material de partida para un futuro PEE preparado con un solvente lipofílico.	Chrubasik-Hausmann <i>et al.</i> , 2014.
Jugo de granadas (JG) (<i>Punica granatum</i> L.)	Ensayo controlado aleatorizado de ramas paralelas. 6-semanas 200 ml/día de JG sin azúcar ni aditivos.	50 pacientes no diabéticos con OA de rodilla y 38 completaron este ensayo. (4M/34F) 30-80 años de edad. Obesidad clase I y sobrepeso	- Disminución significativa de las puntuaciones totales de WOMAC, rigidez y función física en el grupo de JG vs control. - Disminución significativa de MMP-13 sérica y aumento significativo de la glutatión peroxidasa (GPx) en el grupo de JG vs control después del estudio. - No hubo cambios significativos en la puntuación del dolor después de la intervención.	Ghoochani <i>et al.</i> , 2016.
Polvo de escaramujo o rosa mosqueta (PEE)	Estudio de fase III, doble ciego, RPCT paralelo. 12-semanas 5 g/día de PEE (5+5 cápsulas) durante las 3 semanas iniciales. Las siguientes 9 semanas, la dosis se redujo a 2,5 g diarios (5 cápsulas).	120 pacientes con OA de cadera y/o rodilla. (M/F) ≥ 40 años de edad.	- Correlación positiva significativa entre el PC del paciente y la puntuación de los síntomas, al representar gráficamente las puntuaciones de los síntomas vs PC en el grupo PEE. - Cuanto menor es PC, mayor es la disminución de las puntuaciones de los síntomas de dolor y actividad de la vida diaria. - No hay correlación significativa en el grupo PLA entre las puntuaciones y el PC en ninguno de los parámetros evaluados. - Aumento significativo menor en HDLc después de 12 semanas con PEE vs otros grupos. Ningún cambio en CT o LDLc. - La variación estacional esperada de CRP en el grupo PLA (aumento del 32 %). El 18 % de CRP disminuye significativamente en el grupo PEE. - El tratamiento con dosis bajas de PEE no disminuye los síntomas de OA al evaluar todo el grupo de pacientes.	Marstrand <i>et al.</i> , 2017.

<p>Bebida reconstituyente de frutillas liofilizadas (FL).</p>	<p>Ensayo cruzado, aleatorizado y doble ciego. 26-semanas Bebida FL (50 g/día), equiv a 500 g de frutillas frescas (66 mg de antocianinas como equiv a Cn-3-O-Glu).</p>	<p>17 adultos obesos, no fumadores y no diabéticos con OA de rodilla. (4M/13F) 57 ± 7 años de edad.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Los biomarcadores séricos IL-6, IL-1β y MMP-3, así como el dolor constante, intermitente y total, disminuyen significativamente después de la bebida FL vs el grupo control. - No hay efectos del tratamiento en los perfiles de CRP, nitrito, glucosa y lípidos. 	<p>Schell <i>et al.</i>, 2017.</p>
<p>Frutillas liofilizadas (FL).</p>	<p>RPCT cruzado. 26-semanas Bebida FL (50 g/día), equiv a 500 g de frutillas frescas; 66 mg de antocianinas.</p>	<p>17 pacientes obesos, no fumadores y con OA de rodilla completaron el estudio, a partir de 35 evaluados, (4M/13F) 57 ± 3 años de edad.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Las frutillas alivian el dolor. - Sólo se detectan 12 biomarcadores de inflamación de los 24 examinados en todas las muestras. - Las frutillas disminuyen significativamente el TNF-α circulante y su receptor soluble sérico 2 (sTNF-R2). - No se observan cambios en otros biomarcadores de la superfamilia TNF, ni en las hormonas séricas relacionadas con la obesidad o la osteocalcina, PC o WC. - Los biomarcadores séricos de estrés oxidativo, 4-hidroxinonenal y dienos conjugados, también disminuyen significativamente. Las frutillas disminuyen los productos de peroxidación lipídica en adultos obesos con OA de rodilla. 	<p>Basu <i>et al.</i>, 2018.</p>
<p>Polvo liofilizado de arándanos enteros (PLAE).</p>	<p>RPCT de doble ciego. 4-meses 2 paquetes/día de PLAE (20 g cada uno), reconstituidos en 10-12 oz de agua, antes del consumo.</p>	<p>63 pacientes con OA de rodilla, no diabéticos y no fumadores. (16M/47F) 45-79 años de edad. Obesidad clase I.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Las puntuaciones totales de WOMAC, incluidos los subgrupos de dolor, rigidez y dificultad para realizar actividades diarias, disminuyen significativamente en el grupo tratado con PLAE vs PLA. - Aumento significativo de IL-13 y disminución de MCP-1 en el grupo PLAE. - No hay cambios significativos en TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, MMP-3 y MMP-13 en ambos grupos. - Aumento significativo en % de apoyo simple en caminar a ritmo normal para ambas extremidades y disminución significativa en % de apoyo doble para ambas extremidades en el grupo PLAE. - Ligeramente aumento en ROM para ambas rodillas en el grupo tratado con PLAE. - Tendencia creciente en IGF-1 con IGFBP-3 estable en el grupo tratado con PLAE. Disminución de IGF-1 y aumento de IGFBP-3 para PLA durante todo el estudio. 	<p>Du <i>et al.</i>, 2019a, 2019b.</p>
<p>Estudios observacionales sobre la osteoartritis</p>				
<p>OA de rodilla en tres países de América Latina</p>	<p>Estudio observacional, transversal de pacientes con OA sintomática de rodilla, derivados de centros médicos de primera atención a servicios de reumatología. 12-meses</p>	<p>1210 pacientes (Argentina 398; Brasil 402; México 410) con diagnóstico de OA de rodilla (criterios ACR). (M/F; 80,8% F) >18 años de edad; 61,8 años de edad en promedio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El 74% de los pacientes con OA de rodilla tiene limitaciones funcionales, pero muy pocos de ellos perdieron su trabajo debido a la OA de rodilla. - Alrededor del 71% ha tomado medicamentos, pero el 63% depende de su propio bolsillo para afrontar el costo de la OA de rodilla. - La mayoría de las variables demográficas y clínicas difieren entre países, en particular el nivel de dolor, discapacidad, tratamiento y acceso a la atención. La variable país de origen influye en el nivel de dolor, discapacidad y uso de NSAIDs en los modelos de regresión logística; la edad, el dolor, el tratamiento y el acceso a la atención médica influyen en al menos 2 de los modelos. - La carga de OA de rodilla en Argentina, Brasil y México depende de variables demográficas, clínicas y terapéuticas, incluido el sistema de salud. 	<p>Burgos-Vargas <i>et al.</i>, 2014.</p>
<p>OA en América Latina: Características demográficas y clínicas</p>	<p>Estudio multicéntrico, descriptivo, observacional, de corte transversal en 13 países de América Latina. Durante 3 meses</p>	<p>3040 pacientes con OA (~88% OA primaria; criterios ACR). Se incluyen pacientes con OA cervical y lumbar. (M/F) (1:4,8). 62,5 años de edad en promedio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - IMC > 30 kg/m². Se encontró obesidad en 38,2%. Articulaciones con OA: rodillas 31,2%; manos 9,5%; manos y rodillas 22,9%; articulaciones interfalángicas proximales y distales (OA erosiva) 6,5%; axial 6,6%; cadera 1,3%. Gravedad radiográfica de grado 2 o 3 de Kellgren y Lawrence (KL): 88,5%. - Tratamiento de OA: principalmente con NSAIDs, también en combinación con sulfato de glucosamina/condroitina y visco-suplementos. - Comorbilidades asociadas: hipertensión (39%); obesidad (36,3%); diabetes mellitus (12%); sin comorbilidad (12,7%). 	<p>Reginato <i>et al.</i>, 2015.</p>
<p>OA temprana de rodilla (eKOA: <i>early</i>)</p>	<p>Estudio transversal</p>	<p>164 pacientes con eKOA (KL ≤ 2). (110 sin MetS y 54 con MetS) y 42 HS. (M/F) (87% F)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - IMC es significativamente mayor en pacientes con eKOA MetS (31,32 ± 4,08) vs eKOA sin MetS (28,76 ± 4,34) y HS (26,48 ± 4,83). 	<p>Espinosa <i>et al.</i>, 2016.</p>

<p><i>knee OA</i>) vs sujetos sanos (HS) en una población mejicana</p>		<p>en eKOA y 95% F en HS). 47,56 años de edad en promedio (pacientes eKOA) vs 46,92 años de edad en promedio.</p>	<p>- [Adipoquinas] son más altas en el grupo eKOA vs HS; la leptina es 962 vs 490; la adiponectina 62 602 vs 37 391, la resistina 31 047 vs 11 174. - Entre los grupos eKOA, OA con MetS muestra una [leptina] más alta y la OA sin MetS la más alta [adiponectina] y [resistina]. - Los pacientes eKOA con MetS tienen los niveles más altos de citoquinas inflamatorias, como TNF-α, IL-6, IL-8, NGF, quimioquinas MCP-1 y PAI-1 vs eKOA sin MetS. - Es probable que en la población latinoamericana se presenten fenotipos metabólicos, inflamatorios o combinaciones de ambos en la OA de rodilla. Es necesario analizar las posibles implicancias de estas diferencias en las manifestaciones clínicas (dolor, calidad de vida, imágenes de impacto).</p>	
<p>Dieta mediterránea y OA de rodilla</p>	<p>Estudio de cohorte longitudinal Período medio de seguimiento de 4 años.</p>	<p>4330 sujetos con dolor de rodilla o alto riesgo de desarrollar OA de rodilla (M/F) (58,0 % F). 61,1 años de edad en promedio.</p>	<p>- Los sujetos con una alta adherencia a la dieta mediterránea (Q5) presentan un menor riesgo de empeoramiento del dolor vs aquellos que tienen puntuaciones más bajas (Q1), según un análisis multivariable de regresión de Poisson. - Una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asocia con un menor riesgo de OA de rodilla sintomática radiográfica durante el seguimiento en un 9 % (Q5 vs Q1) en 2994 sujetos sin OA de rodilla radiográfica al inicio del estudio. - No surgen asociaciones significativas entre una puntuación de dieta mediterránea validada (aMED) y la incidencia de OA radiográfica.</p>	<p>Veronese <i>et al.</i>, 2019.</p>
<p>La Iniciativa OA (<i>The OA Initiative</i>)</p>	<p>Estudio de cohorte longitudinal, lanzado por NIH. Seguimiento de los participantes durante ≤ 72 meses.</p>	<p>4796 sujetos con OA de rodilla de leve a moderada. (M/F) 62 años de edad en promedio.</p>	<p>- La investigación de la Iniciativa OA se basa en la asociación de los principales patrones dietarios derivados del análisis de componentes principales (PCA) con la progresión radiográfica y sintomática de la OA de rodilla. - A medida que aumenta la puntuación del patrón prudente (<i>prudent pattern score</i>), el riesgo de empeoramiento de KL disminuye significativamente, junto con la pérdida de la amplitud del espacio articular y la disminución de las probabilidades de una mayor progresión de WOMAC (<i>odds of higher WOMAC progression</i>) en modelos ajustados multivariables. - Un patrón dietario prudente basado en el consumo de frutas, verduras, legumbres, pescado y cereales integrales se asocia con una disminución de la progresión radiográfica y sintomática de OA de rodilla vs una dieta occidental que aumenta la OA de rodilla.</p>	<p>Xu <i>et al.</i>, 2020.</p>

Los criterios de exclusión para el reclutamiento se informan en la Ref. correspondiente.

En todos los estudios, los pacientes con OA fueron informados sobre el objetivo y el procedimiento de la investigación, los beneficios y los riesgos, y tuvieron la libertad de abandonar en cualquier momento. Una vez informados sobre el estudio, los participantes firmaron el consentimiento informado por escrito. Los protocolos de los ensayos clínicos fueron aprobados por los Comités de Ética de las instituciones académicas participantes.

Abreviaturas: ACR (*American College of Rheumatology*): Colegio Americano de Reumatología; [Adipoquinas]: concentración de adipoquinas; [adiponectina]: concentración de adiponectina; ANOVA (*analysis of variance*): análisis de varianza; CRP (*C-reactive protein*): proteína C reactiva; CT: colesterol total; Cn: cianidina; eKOA (*early knee OA*): OA de rodilla temprana; F: género femenino; g/d: gramos por día; GPx: glutatión-peroxidasa; HDLc (*high-density lipoprotein cholesterol*): colesterol de lipoproteínas de alta densidad; HS (*healthy subjects*): sujetos sanos; hsCRP (*high-sensitivity C-reactive protein*): proteína C reactiva de alta sensibilidad; IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*): factor de crecimiento similar a la insulina 1; IGFBP-3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*): proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 3; IMC: índice de masa corporal; KL: Kellgren y Lawrence; KOOS (*Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*): puntuación de resultados de lesión de rodilla y osteoartritis; LDLc (*low-density lipoprotein cholesterol*): colesterol de lipoproteína de baja densidad; M: género masculino; [leptina]: concentración de leptina; MetS (*metabolic syndrome*): síndrome metabólico; NGF (*nerve growth factor*): factor de crecimiento nervioso; NIH (*National Institutes of Health*): Institutos Nacionales de Salud de EE.UU.; NSAIDs (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*): fármacos antiinflamatorios no esteroideos; OA: osteoartritis; PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*): inhibidor del activador del plasminógeno-1; PC: peso corporal; PCA (*Principal Component Analysis*): análisis de componentes principales; PLA: placebo; [resistina]: concentración de resistina; ROM (*range of motion*): rango de movimiento; RPCT (*randomized PLA-controlled trial*): ensayo aleatorizado controlado con PLA; vit: vitamina; WC (*waist circumference*): circunferencia de la cintura; WOMAC (*Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index*): índice occidental de osteoartritis McMaster de Ontario.

8.4. Efectos de los alimentos ricos en antocianinas en pacientes con sobrepeso/obesidad en ensayos clínicos en humanos

La obesidad es un trastorno metabólico multifactorial y una enfermedad inflamatoria, caracterizada por un IMC ≥ 30 kg/m² (De Lorenzo *et al.*, 2019). Además, se han detectado niveles desregulados de adipoquinas/citoquinas y desequilibrio de las citoquinas de las células T colaboradoras de tipo 1 (T_H1, *T helper cell type-1*) y tipo 2 (T_H2, *T helper cell type-2*) (Ignacio *et al.*, 2014). La obesidad en adultos se asocia con el riesgo de enfermedades crónicas, como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, accidente cerebrovascular, apnea del sueño, algunos cánceres y artrosis (Dale *et al.*, 2017; Winter & Bickford, 2019).

Las lesiones, la edad y la obesidad (trastornos del metabolismo lipídico y óseo) están asociadas con artrosis, como se demostró en los ensayos clínicos de la **Tabla 8.2**, donde la mayoría de los pacientes con artrosis tenían sobrepeso u obesidad. Además, la obesidad aumenta el estrés mecánico en la articulación y los cartílagos (Messier *et al.*, 2005). Por lo tanto, perder peso alivió los síntomas de artrosis en pacientes obesos con osteoartritis debido a la disminución de las cargas en la rodilla, así como la producción y respuesta de factores inflamatorios (Messier *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2008). Una predisposición genética, la dieta y la falta de ejercicio contribuyen a la obesidad. La obesidad se ha considerado una "enfermedad epigenética". La nutrición puede afectar la expresión genética y las antocianinas dietarias pueden alterar los mecanismos celulares epigenéticos (Vanhees *et al.*, 2014).

En la **Tabla 8.3** se muestran veintidós ensayos clínicos seleccionados en pacientes con sobrepeso y obesidad, sin ninguna enfermedad sintomática. Hay veintiún estudios de intervención y un estudio observacional (Guo *et al.*, 2017). Los ensayos clínicos realizados en sujetos con sobrepeso/obesidad y dislipidemia abordan los perfiles lipídicos, las enzimas implicadas, incluidos los parámetros antioxidantes y antiinflamatorios, ya que la obesidad suele ir acompañada de estrés oxidativo e inflamación (**Tabla 8.3**).

Se obtuvieron hallazgos prometedores a partir de marcadores séricos y urinarios exhaustivos. También se proporcionaron análisis estadísticos adecuados (Udani *et al.*, 2011; Alqurashi *et al.*, 2016; Abubakar *et al.*, 2019).

Se utilizaron tratamientos en ensayos clínicos con bayas mixtas (moras, arándanos, frambuesas y frutillas) (Solverson *et al.*, 2019), jugo de arándanos (Chew *et al.*, 2019), moras (Solverson *et al.*, 2018), frutillas (Basu *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016) y el jugo comercial Medox (arándanos y grosellas negras) con 40, 80 y 320 mg/día de antocianinas (Zhang *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021), bayas de maqui (Davinelli *et al.*, 2015), aronias (Kardum *et al.*, 2014), soja negra (Lee *et al.*, 2016), cerezas cornalinas (Asgary *et al.*, 2013), zanahorias moradas (Wright *et al.*, 2013), jugo de bayas de juçara (Santamarina *et al.*, 2020) y bayas de açai (Udani *et al.*, 2011; Alqurashi *et al.*, 2016; Aranha *et al.*, 2020) (**Tabla 8.3**).

Se observó una disminución de la insulina sérica y la glucorregulación posprandial (Solverson *et al.*, 2019), aumento del colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDLc, *high-density lipoprotein cholesterol*) (colesterol bueno), disminución de la CRP (mejora del

estado inflamatorio) y aumento del interferón-*gamma* (IFN- γ) (mediador inflamatorio secretado por las células T_{h1}) (**Tabla 8.3**).

Las antocianinas derivadas de bayas produjeron efectos favorables en las concentraciones de lipoproteínas (Qin *et al.*, 2009), como: disminución de la concentración de LDLc (colesterol malo) y aumento de la de HDLc (colesterol bueno), sin efecto sobre el colesterol total (CT). Actualmente, el aumento del HDLc se considera importante para prevenir y controlar las enfermedades cardiovasculares. Los autores descubrieron que las antocianinas de las bayas se comportaban como auténticos inhibidores de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP, *cholesteryl ester transfer protein*), en particular Cn-3-*O*-glucósido (Qin *et al.*, 2009). Es decir que, la suplementación con antocianinas redujo el LDLc sérico y aumentó el HDLc en parte, vía la inhibición de la CETP diana (**Tabla 8.3**).

Las citoquinas IL-6, TNF- α y los marcadores oxidativos urinarios 8-isoprostaglandina F_{2 α} (8-iso-PGF_{2 α} , *8-isoprostaglandin F_{2 α}*), 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) y malonaldehído sérico (MDA) disminuyeron al final del ensayo (Zhang *et al.*, 2020).

La ingesta de un extracto estandarizado de bayas de maqui también disminuyó significativamente la lipoproteína de baja densidad oxidada plasmática (OxLDL, *oxidized low-density lipoprotein*) y la 8-iso-PGF_{2 α} en sujetos con sobrepeso, mostrando las marcadas propiedades antioxidantes de estas bayas en un ensayo simple y bien diseñado (Davinelli *et al.*, 2015).

El resto de los ensayos mostró los análisis de perfiles lipídicos y algunos parámetros involucrados en el metabolismo lipídico, como los ensayos completos bien diseñados sobre aronias (Kardum *et al.*, 2014) y soja negra (Lee *et al.*, 2016). Estos estudios son relevantes principalmente para sujetos dislipidémicos, quienes se caracterizan por tener riesgo de enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares. La mayoría de las fuentes de alimentos son diferentes tipos de bayas, a excepción del té de Rosella, las zanahorias moradas y la soja negra (**Tabla 8.3**).

La tendencia a la mejora del perfil lipídico, del estado de la apolipoproteína y de la inflamación vascular se demostró en un ensayo sobre el consumo de cerezas cornalinas (Asgary *et al.*, 2013). Las antocianinas dietarias de los jugos de frutas generalmente interactúan con las moléculas de adhesión celular (CAMs, *cellular adhesion molecules*), suprimiendo la expresión inducida por TNF- α de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*) y subregulando la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*). Sin embargo, sólo apoA1 mostró una diferencia significativa y una diferencia limítrofe para ICAM-1 (Asgary *et al.*, 2013).

Se demostró la mejora de la función vascular posprandial después del consumo del té de Rosella (extracto de cálices de *Hibiscus sabdariffa L.*) (Abubakar *et al.*, 2019). Los efectos deseados del té de Rosella sobre la obesidad se han atribuido típicamente a las antocianinas. Sin embargo, las flores también contienen ácidos orgánicos como el ácido hibiscus, el ácido dimetilhibiscus y los ácidos hidroxicítricos que pueden contribuir a estos efectos (Morales-Luna *et al.*, 2019) (**Tabla 8.3**).

El ensayo en humanos de más largo plazo sobre los efectos del consumo de cerezas ácidas se incluyó en la **Tabla 8.3** (Chai *et al.*, 2019). Este estudio demostró que el jugo de cerezas redujo significativamente la presión arterial y LDLc (colesterol malo), probablemente a través de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, respaldadas por el aumento significativo en la actividad de reparación del ADN de la enzima 8-oxoguanina glicosilasa (OGG1) y la disminución de la CRP, MDA y OxLDL plasmáticos (Chai *et al.*, 2019). También el jugo de cerezas disminuyó significativamente MCP-1 proinflamatorio en adultos con sobrepeso/obesidad (Martin *et al.*, 2018).

Las antocianinas de júcara revirtieron el proceso proinflamatorio producido en sujetos obesos que tenían niveles disminuidos de IL-10, citoquina antiinflamatoria asociada con IL-6 y TNF- α , mediada por TNF tipo 1 (TNFR1, *TNF receptor type-1*) (Santamarina *et al.*, 2018, 2020). Un ensayo similar con resultados prometedores fue diseñado satisfactoriamente para las bayas de açai (Udani *et al.*, 2011; Alqurashi *et al.*, 2016; Aranha *et al.*, 2020).

El estudio observacional incluido en la **Tabla 8.3** ha sido diseñado adecuadamente para un seguimiento de 5 años de una gran población obesa, lo que conduce a una asociación significativa inversa entre la excreción urinaria de polifenoles totales y las medidas antropométricas relacionadas con la obesidad (Guo *et al.*, 2017).

Estos estudios demostraron claramente que las antocianinas actúan como agentes eficaces para el tratamiento de la artrosis mediante la inhibición de las respuestas oxidativas e inflamatorias. Estas últimas desempeñan un papel importante.

Tabla 8.3. Ensayos clínicos en humanos sobre los efectos de los alimentos ricos en antocianinas en pacientes con sobrepeso/obesidad.

Matriz alimentaria	Diseño del estudio. Duración. Dosis.	Pacientes con OA: n, (género), edad	Principales hallazgos	Ref.
Cápsulas Medox; antocianinas de arándanos (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.) y grosellas negras (<i>Ribes nigrum</i> L.)	RPCT doble ciego. 12- semanas 2 cápsulas de 80 mg de antocianinas, dos veces al día (después del desayuno y la cena). Ingesta total: 320 mg de antocianinas/día.	120 sujetos dislipidémicos (F/M) 40-65 años de edad. IMC 22,4-30,7 kg/m ² .	- Aumento significativo de [HDLc] en el grupo de antocianinas vs PLA. - Disminución significativa de [LDLc] en el grupo de antocianinas vs PLA. - El eflujo del colesterol celular al suero aumenta significativamente en el grupo de antocianinas vs PLA. - Disminución de la masa y la actividad de CETP plasmática en el grupo de antocianinas vs PLA. - En el grupo de antocianinas, el cambio en HDLc se correlaciona negativamente con el cambio en la actividad de CETP. - El cambio en LDLc se correlaciona positivamente con el cambio en la masa de CETP. - El cambio en el eflujo de colesterol celular al suero se correlaciona positivamente con el cambio de HDLc.	Qin <i>et al.</i> , 2009.
-Bayas de açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	Estudio piloto, abierto, no controlado. 1-mes de tratamiento 100 g de pulpa de açai dos veces al día. Pulpa de açai: 0,77 mg/mL de antocianinas totales como equiv a Cn-3-O-Glu.	10 adultos con sobrepeso (5M/5F) 18-65 años de edad. IMC: 25-30 kg/m ²	- Disminución significativa de los niveles de glucosa e insulina en ayunas después de 30 días de tratamiento vs valor inicial (o línea de base). - Disminución significativa del CT y disminuciones significativas límítrofes de LDLc y CT/HDLc. - En comparación con el valor inicial, el açai disminuye significativamente el aumento posprandial de la glucosa plasmática. - Sin efecto sobre la presión arterial, la hsCRP o los metabolitos del NO exhalado	Udani <i>et al.</i> , 2011.
Cerezas cornalinas (<i>Cornus mas</i> L.) (CM)	RPCT. 6-semanas 2 x 50 g/día de frutas frescas después del almuerzo y la cena. No se midió el contenido de antocianinas en los frutos de cerezas cornalinas.	40 niños y adolescentes dislipidémicos. 9-16 años de edad.	- Después de 6 semanas, disminución significativa de CT, GT, LDLc, ApoB, ICAM-1 y VCAM-1 en el grupo CM, y aumento de HDLc y ApoA1 vs valor inicial. Sólo ICAM-1 cambia significativamente en el grupo control. - La comparación entre grupos muestra una diferencia significativa sólo para ApoA1, una diferencia significativa límítrofe para ICAM-1 y ninguna diferencia significativa para IMC, WC/HC o CRP.	Asgary <i>et al.</i> , 2013.
Extracto de zanahorias moradas secas	RPCT doble ciego. 4-semanas 3 sobres de 8,3 g de zanahorias moradas secas con la primera comida, almuerzo y cena (equiv al contenido de antocianinas: 39,5 ± 1,3 mg/sobre).	16 voluntarios sanos con marcadores lipídicos e inflamatorios normales (M) 18-65 años de edad. IMC: 25-35 kg/m ² . Obesidad clase I.	- No hay un efecto significativo de las antocianinas de las zanahorias moradas sobre la masa corporal, la composición corporal, WC, LDLc, CT, la presión arterial, la proteína C reactiva o la inflamación sistémica en los participantes obesos, a la dosis y la duración del ensayo. - Tendencia hacia niveles más bajos de apetito general en el grupo de zanahoria. - HDLc es significativamente más bajo en el grupo de zanahoria. - AST y ALAT no cambian, lo que indica que la intervención es segura.	Wright <i>et al.</i> , 2013.
Frutillas liofilizadas (FL).	Ensayo controlado, aleatorizado, de dosis-respuesta, de 4 ramas. 12-semanas Bebidas con 25 g/día o 50 g/día de FL. Antocianinas totales en mg equiv a Cn-3-O-Glu: FL de dosis baja: 78; FL de dosis alta: 155.	60 voluntarios (5M/55F) 49 ± 10 años de edad. IMC: 36 ± 5 kg/m ² Obesidad clase II	- Los análisis de dosis-respuesta revelan disminuciones significativamente mayores en CT y LDLc séricos y en las partículas LDL pequeñas derivadas de RMN en los pacientes con dosis altas de FL vs pacientes con dosis bajas de FL durante 12 semanas. - Sólo la disminución en CT y LDLc en los pacientes con dosis altas de FL siguen siendo significativas vs control durante 12 semanas. - Ambas dosis de FL muestran una disminución similar en MDA sérico a las 12 semanas vs controles. - FL no afecta ninguna medida de adiposidad, presión arterial, glucemia y [HDLc], [GT], [CRP] y moléculas de adhesión séricas.	Basu <i>et al.</i> , 2014.
Suplemento de jugo de Aronia. <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.) Elliott.	4-semanas 100 mL/día de suplemento. Antocianinas totales: 15,3 ± 0,2 mg Cn-3-O-Glu equiv/100 mL.	20 participantes (F) 45-65 años de edad. IMC: 36,1 ± 4,4 kg/m ² Obesidad clase II	- Aumento significativo de los PUFAs n-3 en los fosfolípidos de membrana. - Aumento significativo marcado de DHA. - Disminución significativa en la relación de FA n-6 y n-3. - Aumento significativo en la actividad de GPx. - Disminución significativa en IMC, WC y PA sistólica después de la intervención.	Kardum <i>et al.</i> , 2014.
Extracto de bayas de maqui (EBM)	RPCT doble ciego. 4-semanas	42 sujetos sanos, con sobrepeso y	- Disminución significativa de Ox-LDL en el grupo EBM vs valor inicial. - Disminución significativa de 8-iso-PGF _{2α} urinaria a las 4 semanas vs el valor inicial en el grupo EBM. Sin	Davinelli <i>et al.</i> , 2015.

<p>[<i>Aristotelia chilensis</i> (Molina) Stuntz] (Delfinol)</p>	<p>3 cápsulas de 150 mg de EBM (54 mg de antocianinas/cápsula; 162 mg de antocianinas totales/día)</p>	<p>fumadores. 45-65 años de edad.</p>	<p>embargo, no hubo diferencias a los 40 días de seguimiento. - En la cuarta semana, no hubo diferencias significativas en las características antropométricas, la presión arterial y el perfil lipídico.</p>	
<p>Batido de açai (BA)</p>	<p>Ensayo controlado aleatorizado, doble ciego, cruzado, de intervención dietaria aguda con alto contenido de grasas. 1-día de experimento Un batido de Açai (BA) (150 g) con un desayuno rico en grasas. 493 mg de antocianinas/porción de 200 g.</p>	<p>23 voluntarios sanos, no fumadores y con sobrepeso (M) 30-65 años de edad. IMC 25-30 kg/m²</p>	<p>- BA mejora la función vascular, con aumento posprandial de FMD desde la línea de base de 1,4 % a las 2 h vs 0,4 % después del consumo del control, y aumentos a las 6 h en 0,8 % para BA vs 0,3 % para el control. - Un AUC incremental significativamente menor para el estado oxidativo de peróxido total después de la ingesta de BA vs control. - No hay cambios significativos en la presión arterial, la frecuencia cardíaca o la respuesta de la glucosa posprandial. Sin embargo, el primer pico de insulina posprandial (después del desayuno) y AUC incremental para la insulina aumentan para BA vs control.</p>	<p>Alqurashi <i>et al.</i>, 2016.</p>
<p>Testa de soja negra [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.].</p>	<p>RPCT doble ciego. 8-semanas 2 cápsulas antes de cada una de las 3 comidas diarias (dosis: 2,5 g/día). Dosis de antocianinas: 31,45 mg/día.</p>	<p>63 adultos obesos o con sobrepeso (M/F) 19-65 años de edad. IMC > 23 kg/m²</p>	<p>- Disminución significativa de los marcadores de grasa abdominal (WC y HC) y de todos los marcadores metabólicos (CT, GT, LDLc y no HDLc) en el grupo tratado vs PLA al final del ensayo. - Disminución significativa de los marcadores hematológicos de aterosclerosis, como CT/HDLc y LDLc/HDLc para el grupo de soja, pero sin cambios en el grupo PLA. - Correlaciones positivas fuertes y significativas entre la masa de grasa corporal y IMC, WC y IMC, y WC y la relación cintura-cadera antes y después del tratamiento. - No hay diferencias entre ambos grupos en cuanto a energía, ingesta dietaria ajustada y actividad física: El grupo de soja mejora considerablemente los perfiles lipídicos plasmáticos, relacionados con la disminución de WC (marcador de grasa abdominal) siempre que se mantengan dietas ricas en fibra dietaria y bajas en colesterol.</p>	<p>Lee <i>et al.</i>, 2016.</p>
<p>Frutillas liofilizadas (FL).</p>	<p>Ensayo controlado aleatorizado, cruzado, de dosis-respuesta, controlado con dieta, simple ciego, de cuatro ramas. 6-horas Bebida con 0 g, 10, 20 o 40 g de FL. Antocianinas totales (mg/bebida): 10 g de FL: 42,2; 20 g de FL: 87,9; 40 g de FL: 154,5.</p>	<p>21 adultos no diabéticos y no fumadores (F/M) con RI. > 18 años de edad.</p>	<p>- Disminución significativa de la [insulina] posprandial (6 h) después de la bebida de 40 g de FL vs otras bebidas. - No hay diferencia en la [glucosa] 6 h posprandial, pero el cociente insulina/glucosa es significativamente diferente entre las bebidas. - Pg-glucurónido está significativamente asociado de manera inversa con [insulina] media después de 20 y 40 g de FL. - Disminución significativa de Ox-LDL después de 20 g de FL; IL-6 no es diferente entre los tratamientos. - La ingesta de frutillas disminuye la demanda de insulina para controlar la glucosa posprandial en obesos con resistencia a la insulina (RI), que está relacionada con la [antocianinas/Pg] plasmática. - Las frutillas mejoran la sensibilidad a la insulina en sujetos con RI.</p>	<p>Park <i>et al.</i>, 2016.</p>
<p>Jugo de cerezas ácidas (JCA)</p>	<p>Estudio piloto cruzado, RPCT. 10-semanas Ingesta de 240 ml/día. Contenido de JCA: 9,9-241,2 mg de antocianinas totales/8 oz de JCA.</p>	<p>10 participantes en riesgo (8F/2M) 38,1 ± 12,5 años de edad promedio. IMC > 25,0 kg/m² 5 obesos, 5 con sobrepeso</p>	<p>- JCA disminuye significativamente la velocidad de sedimentación globular o de eritrocitos (VSG) (marcador de inflamación crónica) vs PLA, que aumenta VSG en un 19 %. - JCA no afecta a [hsCRP] (marcador de inflamación aguda). hsCRP basal media es de 7,0 ± 5,2 mg/L. - JCA disminuye la quimioquina MCP-1 y la citoquina TNF-α vs PLA. - IL-6 e IL-10 plasmáticas no son diferentes entre los tratamientos.</p>	<p>Martin <i>et al.</i>, 2018.</p>
<p>Bayas de júcara (<i>Euterpe edulis</i> Mart.)</p>	<p>RPCT doble ciego. 6-semanas 5 g/d de pulpa liofilizada de júcara, equiv a 50 g de pulpa de júcara fresca. Antocianinas totales (mg/100 g de frutas frescas) 262,4 ± 8,6.</p>	<p>27 participantes obesos (F/M) 31-59 años de edad. IMC 30,0-39,9 kg/m² Obesidad clase I y II</p>	<p>- Júcara mejora el perfil sérico de AGs en los niveles de AGs insaturados. - Los marcadores epigenéticos mejoran después del tratamiento. - El nivel de ADN metilado aumenta después del tratamiento. - El suplemento de Júcara es un predictor de la proteína-2 de unión a metil-CpG (MeCP2: <i>methyl-CpG binding protein 2</i>) en monocitos.</p>	<p>Santamarina <i>et al.</i>, 2018.</p>
<p>Moras</p>	<p>RPCT cruzado, con 2 tratamientos. 1-semana de tratamiento + test de tolerancia a la glucosa basado en comidas (MTT)+24 h + 1 semana de lavado + 1 semana de tratamiento</p>	<p>27 sujetos con sobrepeso u obesidad M. IMC > 25 kg/m².</p>	<p>- Disminución significativa del cociente respiratorio (RQ) promedio de 24 h en moras vs gelatina (GEL, control sin flavonoides) debido al aumento de la oxidación de grasas. Durante MTT, RQ disminuye significativamente con moras vs GEL. Un aislamiento de 4 h durante la cena muestra efectos de tratamiento similares, donde RQ disminuye y la oxidación de grasas aumenta con moras (moras vs GEL). - El área bajo la curva (AUC) de glucosa no es diferente entre los tratamientos con moras y GEL durante</p>	<p>Solverson <i>et al.</i>, 2018.</p>

	2x 300 g/día moras (desayuno y cena). Dosis de moras: ~361 mg/día de antocianinas totales.		MTT. - AUC de insulina disminuye significativamente con moras vs GEL y HOMA-IR mejora con moras.	
Extracto de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (EHS) (té de Rosella)	Ensayo controlado aleatorio, cruzado, agudo, simple ciego. 2-semanas y 8-horas 250 mL de EHC después de un desayuno rico en grasas. Equiv a 150 mg de antocianinas y 311 mg de GAE.	25 participantes con enfermedades hepáticas o crónicas. 30-65 años de edad. (M).	- Aumento significativo del % de FMD, disminución no significativa de la presión arterial sistólica y diastólica; aumento no significativo del NO urinario y plasmático y disminución de la respuesta de los niveles de glucosa sérica, insulina plasmática, GT y CRP séricos. - Mejora significativa del área bajo la curva de respuesta antioxidante sistémica (0 a 2 h); sin cambios significativos en la rigidez arterial después del consumo de EHS. - El ácido gálico, los ácidos 3- y 4- <i>O</i> -metil gálicos y el ácido hipúrico son los principales metabolitos fenólicos detectados que alcanzan una concentración plasmática máxima 1 h después de la ingesta de EHS.	Abubakar <i>et al.</i> , 2019.
Jugo de cerezas ácidas Montmorency (JCA) (<i>Prunus cerasus</i> L.).	Ensayo controlado aleatorio. 12 semanas 480 ml/día de JCA. Las cerezas ácidas son ricas en antocianinas, específicamente Cn-3- <i>O</i> -GluRut, Cn-3- <i>O</i> -Rut, Cn-3- <i>O</i> -Glu y la aglicona Cn.	37 participantes (M/F), 34 completaron el estudio. 65-80 años de edad. IMC 23,1-32,2 kg/m ² . Sobrepeso/obesidad clase I.	- Después de la intervención, JCA aumenta significativamente los niveles plasmáticos de la actividad de reparación del ADN de OGG1 y disminuye significativamente [CRP] media vs control. - Hay un efecto de grupo significativo para CRP y MDA plasmáticas, y un efecto de grupo significativo limítrofe para las OxLDL plasmáticas. - El análisis intragrupo muestra que los niveles plasmáticos de CRP, MDA y OxLDL disminuyen en un 25 %, 3 % y 11 % respectivamente, después de 12 semanas de ingesta de JCA vs valores iniciales. - La capacidad del JCA para disminuir la presión arterial sistólica y LDLc, en parte, puede deberse a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.	Chai <i>et al.</i> , 2019.
Bebida de extracto de arándanos (BEA).	RPCT de diseño paralelo, doble ciego. 8-semanas 450 mL/día de BEA con alto contenido de polifenoles.	78 sujetos con sobrepeso u obesidad y adiposidad abdominal (M/F) 30-70 años de edad. IMC 27-35 kg/m ²	- En la línea de base, al inicio, disminución significativa de endotelina-1 y aumento de NO y glutatión reducido/oxidado vs PLA. - Aumento significativo de IFN- γ después de la dosis de BEA al inicio. - Después de 8 semanas de intervención con BEA, disminución significativa de CRP en ayunas. - Disminución significativa de la insulina sérica y aumento de HDLc vs PLA.	Chew <i>et al.</i> , 2019.
Mezcla de bayas ricas en antocianinas (MB) [moras, arándanos, frambuesas y frutillas].	Estudio aleatorizado, cruzado, con 4 períodos de tratamiento. Cada tratamiento: 8-días + 2-semanas de descanso entre ellos. 109 mg/día-218 mg/día, con una ingesta media de 143,5 mg/día. Jugo de bayas: 77 mg/día-155 mg/día de ingesta de antocianinas, con una ingesta media de 101 mg/día.	36 sujetos con sobrepeso/obesidad, no fumadores (M/F) 58,7 años de edad promedio. IMC 30,8 kg/m ² .	- No hay diferencias en la glucosa, la insulina y AGs no esterificados séricos entre los tratamientos individuales. - En un análisis secundario, las preparaciones combinadas de MB disminuyen el AUC de la insulina sérica vs los tratamientos combinados de gelatina, mientras que la diferencia en la glucosa sérica no es significativa.	Solverson <i>et al.</i> , 2019.
Pulpa de Açaí.	RPCT doble ciego. 90-días 200 g de pulpa de açaí. No se midió el contenido de antocianinas.	69 voluntarios.	-La [8-isoprostano] plasmática disminuye significativamente 60 días después de la intervención con açaí. Diferencia significativa entre los grupos de estudio (açaí vs PLA). - Parámetros del estado inflamatorio: IL-6 disminuye significativamente en el grupo con dieta hipoenérgica + açaí, e IFN- γ disminuye significativamente en ambos grupos, el de dieta hipoenérgica + açaí y el de dieta hipoenérgica + PLA; sin embargo, no hay diferencias entre los grupos. Los parámetros del perfil lipídico y los niveles de glucosa en sangre no cambian en ningún grupo de estudio.	Aranha <i>et al.</i> , 2020.
Bayas de Juçara (<i>Euterpe edulis</i> Mart.)	RPCT doble ciego. 6-semanas 5 g de pulpa liofilizada de Juçara. No se midió el contenido de antocianinas.	27 adultos obesos (F/M) 31-59 años de edad. IMC: 30,0-39,9 kg/m ²	- Juçara disminuye el ARNm de TLR4 e IL-6 vs PLA. - Juçara aumenta ARNm de IL-10. La expresión de proteínas de la vía TLR4, respuesta primaria de diferenciación mielóide-88 (MYD88: <i>myeloid differentiation primary response-88</i>), disminuye en el grupo de juçara vs PLA. - Juçara disminuye pIKK α/β vs PLA. Los niveles de proteína del receptor de leptina (Ob-R) son más altos en el grupo de juçara vs pre-tratamiento. La producción de IL-6, TNF- α y MCP-1 por parte de los monocitos	Santamarina <i>et al.</i> , 2020.

			disminuye con el suplemento de juçara vs pre-tratamiento. - IL-10 aumenta en el grupo de juçara con LPS vs pre-tratamiento y vs grupo de juçara sin LPS.	
Cápsulas Medox; antocianinas de arándanos (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.) y grosellas negras (<i>Ribes nigrum</i> L.).	RPCT doble ciego con suplementación de 3 dosis de antocianinas (40, 80 y 320 mg/día) 12-semanas 2 cápsulas dos veces al día después del desayuno y la cena. Las cápsulas Medox contienen 40 mg u 80 mg de antocianinas.	169 participantes dislipidémicos (F/M) 35-70 años de edad.	- El suplemento de antocianinas (320 mg/día) durante 6 semanas mejora significativamente la superóxido dismutasa total vs valor inicial. - Una ligera disminución de IL-6 y TNF- α séricos y 8-iso-PGF _{2α} urinaria del valor inicial a las 12 semanas en el grupo de antocianinas de 40 mg/día. - Las antocianinas (80 mg/día) disminuyen significativamente IL-6 (-20%) y TNF- α (-11%) séricos y la 8-iso-PGF _{2α} urinaria (-27%) vs valor inicial. - El suplemento de antocianinas de 320 mg/día disminuye IL-6 (-40%), TNF- α (-21%) y MDA (-20%) séricos y la 8-iso-PGF _{2α} (-37%) y la 8-OHdG (-36%) urinarias en comparación con las dosis 80 mg/día y 40 mg/día. - Fuerte correlación positiva entre los cambios en los niveles urinarios de 8-iso-PGF _{2α} , 8-OHdG y de IL-6 sérica en sujetos de los grupos de antocianinas después de 12 semanas.	Zhang <i>et al.</i> , 2020.
Cápsulas Medox; antocianinas de arándanos (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.) y grosellas negras (<i>Ribes nigrum</i> L.).	RPCT doble ciego con suplementación de 3 dosis de antocianinas (40, 80 y 320 mg/día). 12-semanas 2 cápsulas dos veces al día después de las comidas. Cápsulas Medox que contienen 40 u 80 mg de antocianinas.	176 sujetos dislipidémicos (F/M) 35-70 años de edad.	- Después de 12 semanas de suplementación: Diferencia significativa en la capacidad de eflujo de colesterol, HDLc y ApoA1 entre los 4 grupos. - En comparación con PLA, 320 mg/día de antocianinas aumentan significativamente la capacidad de eflujo de colesterol (35,8 %), HDLc (0,07 mmol/L) y ApoA1 (0,07 g/L). - El análisis de tendencia lineal mostró que Medox tiene una fuerte relación dosis-respuesta con la capacidad de eflujo de colesterol, HDLc y ApoA1. - El aumento de la capacidad de eflujo de colesterol muestra una correlación positiva con el aumento de HDLc y ApoA1.	Xu <i>et al.</i> , 2021.
Estudio observacional				
ISRCTN35739639	Estudio transversal. 5-años	573 participantes del ensayo PREDIMED. Reclutados en 2 centros.	- Después de un seguimiento de 5 años: Correlaciones inversas significativas entre TPE en el quinto año y PC, IMC, WC y relación cintura-altura.	Guo <i>et al.</i> , 2017.

Los criterios de exclusión para el reclutamiento se informan en la Ref. correspondiente.

Abreviaturas: AGs: ácido grasos; ALAT: alanina aminotransferasa; ApoA1: Apolipoproteína A-I; ApoB: Apolipoproteína B; AST: aspartato aminotransferasa; AUC (*area under the curve*): área bajo la curva; CETP (*cholesteryl ester transfer protein*): proteína de transferencia de ésteres de colesterol; Cn: cianidina; Cn-3-O-Glu: cianidina-3-O-glucósido; Cn-3-O-GluRut: cianidina-3-O-glucosilrutinosido; Cn-3-O-Rut: cianidina-3-O-rutinósido; [CRP] (*concentration of C-reactive protein*): concentración de proteína C reactiva; CT: colesterol total; equiv: equivalentes; DHA (*docosahexaenoic acid*): ácido docosahexaenoico; F: género femenino; FMD (*flow-mediated vasodilatation*): vasodilatación mediada por flujo; GAE (*gallic acid equivalents*): equivalentes de ácido gálico; GPx: glutatión peroxidasa; GT: glicéridos totales; 8-iso-PGF_{2 α} : 8-isoprostaglandina F_{2 α} ; HC (*hip circumference*): circunferencia de cadera; HOMA-IR (*homeostatic model assessment-insulin resistance*): evaluación del modelo homeostático-resistencia a la insulina; [HDLc] (*concentration of high-density lipoprotein cholesterol*): concentración de colesterol de lipoproteína de alta densidad; [hsCRP] (*concentration of high-sensitivity C-reactive protein*): concentración de proteína C reactiva de alta sensibilidad; ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*): molécula de adhesión intercelular-1; IMC: índice de masa corporal; [insulina]: concentración de insulina; [LDLc] (*concentration of low-density lipoprotein cholesterol*): concentración de colesterol de lipoproteína de baja densidad; LPS: lipopolisacárido; M: género masculino; MDA: malonaldehído; MTT (*meal-based glucose tolerance test*): prueba de tolerancia a la glucosa basada en las comidas; PC: peso corporal; RMN: Resonancia Magnética Nuclear; OA: osteoartritis; OGG1: 8-oxoguanina glicosilasa; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; OxLDL (*oxidized low-density lipoprotein*): lipoproteína de baja densidad oxidada; PA: presión arterial; Pg: pelargonidina; PLA: placebo; PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*): ácidos grasos poliinsaturados; RI: resistencia a la insulina; RPCT (*randomized PLA-controlled trial*): ensayo aleatorizado controlado con PLA; RQ (*respiratory quotient*): cociente respiratorio; TLR4 (*toll-like receptor 4* receptor tipo Toll 4); TPE (*total polyphenol excretion*): excreción total de polifenoles; VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*): molécula de adhesión celular vascular-1; VSG: velocidad de sedimentación globular o de eritrocitos; WC (*waist circumference*): circunferencia de la cintura.

8.5. Conclusiones del Capítulo 8

Se sabe que las antocianinas modifican las uniones de los ligandos con los receptores, la permeabilidad de la membrana celular y las vías de señalización intracelular. Por lo tanto, las antocianinas tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, como se muestra en los once ensayos con condrocitos humanos (**Tabla 8.1**) y diecinueve ensayos clínicos en pacientes con osteoartritis (**Tabla 8.2**) y veintidós ensayos en pacientes con sobrepeso/obesidad (**Tabla 8.3**) analizados en esta Tesis. El conjunto de los tres ensayos clave contribuye a la comprensión de los mecanismos y vías subyacentes involucradas. Además, este conjunto muestra el valor de las antocianinas para contrarrestar la progresión de la osteoartritis y obesidad.

La interacción entre la inflamación de la osteoartritis y la obesidad, y la subsiguiente regulación/inmunomodulación se realizó vía las antocianinas dietarias. Las frutillas, las cerezas, las bayas, la granada, las frutas tropicales, el escaramujo, el arroz morado, el maíz morado, los porotos rojos y la soja negra, junto con las agliconas cianidina, delfinidina, malvidina y peonidina, algunos 3-*O*-glucósidos, los metabolitos y las antocianinas aciladas de una variedad de papa han mostrado los mejores resultados.

Si bien los resultados en pacientes con artrosis y sujetos con sobrepeso/obesidad fueron prometedores, especialmente en el caso de las bayas, las frutillas, las cerezas, la soja negra y la granada, se necesitan más ensayos clínicos que incluyan análisis dosis-respuesta.

Aunque se han establecido los beneficios para la salud y la seguridad de las antocianinas en pacientes con artrosis/sobrepeso, se deben realizar más estudios de intervención para determinar las dosis adecuadas para la suplementación con antocianinas, la dosis-respuesta y la duración del consumo, para incluir recomendaciones dietarias para pacientes con artrosis/sobrepeso con fines preventivos y de tratamiento.

Capítulo 9. Parte experimental

9.1. Solventes, reactivos y compuestos químicos

Todos los reactivos, solventes y compuestos químicos utilizados en esta Tesis se obtuvieron de la mayor pureza disponible, de grado analítico. Se usaron metanol, agua y acetonitrilo, grado HPLC, para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) y los mismos solventes, pero grado CL-EM para realizar cromatografía líquida-espectrometría de masa. El agua se purificó con un sistema de purificación Milli-Q Plus para obtener agua ultrapura. Se controló la pureza de los solventes mediante métodos cromatográficos [cromatografía gas-líquido (CGL); HPLC] y los que se usaron con detección UV, para verificar que no contuvieran interferencia que absorbieran al UV (Pomilio & Vitale, 1988).

9.2. Antocianinas aciladas provenientes de *Ipomoea cairica*

9.2.1. Material vegetal

Las plantas de *Ipomoea cairica* (L.) Sweet fueron recolectadas en los parques de la Facultad de Agronomía (Universidad de Buenos Aires) e identificadas por especialistas taxónomos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Prof. Dr. Ing. Ramón Palacios y Prof. Dr. Enrique Zallochi), guardando material de herbario que incluía flores.

9.2.2. Extracción y aislamiento de las antocianinas

Se utilizaron flores frescas. Las flores, una vez separadas de la planta, fueron inmediatamente extraídas repetidas veces con ácido clorhídrico metanólico al 0,1% (v/v) hasta obtener soluciones casi incoloras, en atmósfera de nitrógeno a 0°C. Los sucesivos extractos metanólicos fueron concentrados bajo presión reducida a temperaturas menores de 40°C, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno. Los cromatogramas de los extractos crudos obtenidos con distintos medios fueron comparados respecto al rendimiento y degradación. El medio ácido permitió mantener las antocianinas como sales de flavilio.

El extracto que contenía las antocianinas aciladas se aplicó a una columna Diaion HP-20 (500 × 70 mm) que se lavó con AcOH al 5% y se eluyó con AcOH al 5% en EtOH al 70%. El eluido se separó en fracciones principales mediante Sephadex LH-20 (500 × 70 mm) usando MeOH-AcOH-H₂O (10:1:10, en volumen) como solvente de desarrollo.

9.2.3. Separación de las antocianinas aciladas

La separación de las antocianinas se realizó mediante cromatografía en papel preparativo (descendente), Whatman 3 MM en el cual se sembró el concentrado del extracto original, con extremo de Whatman 1 para absorción gradual del solvente de desarrollo. En la etapa inicial de aislamiento se usó como solvente BAA (*n*-butanol, ácido

acético glacial, agua; 4:1:5, en volumen; fase superior. Preparado inmediatamente antes de su empleo), con tiempos de desarrollo no menores de 30 horas con el fin de lograr buena separación de las bandas. El desarrollo de las cromatografías se realizó en oscuridad y atmósfera de nitrógeno.

Los cromatogramas se analizaron por observación directa y bajo luz UV ($\lambda = 366$ nm). Cada banda fue eluída individualmente usando como eluyentes: AcOH-MeOH-H₂O (5:70:25, en volumen) ó (5:90:5, en volumen) y sometida, previa concentración, a ulteriores purificaciones (como mínimo dos) utilizando los siguientes solventes: BAA, ACA (ácido acético glacial, ácido clorhídrico concentrado, agua; 15:3:82, en volumen). y AcOH 5% (ácido acético glacial-agua; v/v).

También se utilizó **cromatografía en capa delgada** (TLC: *thin-layer chromatography*), analítica y preparativa. Asimismo, se usó **cromatografía en columna a mediana presión** para la purificación de las antocianinas aciladas y **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) para la purificación fina que dio siete polvos amorfos rojos como trifluoracetatos (sales de ácido trifluoroacético: TFA).

9.3. Técnicas cromatográficas

9.3.1. Cromatografía en capa delgada

La **cromatografía en capa delgada** (TLC), analítica y preparativa, en placas comerciales recubiertas con celulosa microcristalina y silicagel o gel de sílice 60 con indicador fluorescente para 254 nm (Silicagel 60 F₂₅₄) utilizando como fases móviles: BAA (*n*-BuOH-AcOH-H₂O, 4:1:5; fase superior), BuHCl (*n*-BuOH-2N HCl, 1:1, v/v) y EAFA (AcOEt-AcOH-HCO₂H-H₂O, 100:11:11:26, en volumen) para las antocianinas y tolueno-AcOH-H₂O (40:10:5, en volumen), BAA (*n*-BuOH-AcOH-H₂O, 4:1:2, en volumen), EtOAc-AcOH-H₂O (3:1:1, en volumen) y EtOAc-HCO₂H-H₂O (5:2:1, en volumen) para los ácidos fenólicos (detección: luz UV) y azúcares.

La cromatografía preparativa se efectuó en placas de celulosa con ácido fórmico al 10% (HCO₂H 10%) como solvente de desarrollo.

9.3.2. Cromatografía de alta resolución en capa delgada (HPTLC, high-performance thin layer chromatography)

Se utilizaron cromatoplasmas de alta resolución de silicagel 60 F₂₅₄ y como solventes de desarrollo: 2-butanol-acetato de etilo-agua (14:12:5 v/v/v) y cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v/v).

9.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), analítica y preparativa

La cromatografía líquida de alta resolución analítica se realizó en columnas de octadecilsilano (ODS; C₁₈; 50 × 4,6 mm + 250 × 4,6 mm) a 25°C con detección a 520 nm. Se utilizaron los siguientes solventes para la elución en gradiente a una velocidad de flujo de 1 ml/min: Solvente A (H₃PO₄ 1,5% en H₂O) y Solvente B (H₃PO₄ 1,5%, CH₃COOH 20%, MeCN 25% en H₂O). Condiciones del gradiente: 0-7 min, gradiente lineal de 25 a 32 % de solvente B en solvente A; 7-47 minutos, gradiente lineal de 32 a 42% de solvente B en solvente A.

Se utilizó también otro sistema de solventes con gradiente lineal durante 20 minutos, desde 40 a 75% de B (MeOH-H₂O-HCO₂H, 75:24,5:0,5, en volumen) en A (H₂O-HCO₂H, 60:1, v/v); luego se mantuvo una elución isocrática durante 10 min.

La cromatografía líquida de alta resolución preparativa se realizó en una columna PREP-ODS (C₁₈; 250 mm × 20 mm d.i.; tamaño de partícula: 10 μm) con una velocidad de flujo de 7 ml/min con una elución isocrática utilizando una mezcla de 88 o 70% del solvente A (CH₃COOH 15% en H₂O) con detección a 520 nm con detector de arreglo de diodos y con el solvente B (CH₃COOH 15%, MeCN 30% en H₂O) con detección a 330 nm.

9.4. Determinación estructural de las antocianinas aciladas

9.4.1. Métodos químicos

Se llevaron a cabo hidrólisis ácida parcial y total, e hidrólisis alcalina. La hidrólisis ácida permitió determinar la aglicona, los azúcares y la presencia de dos derivados del ácido cinámico. La hidrólisis alcalina separó el grupo acilo presente, obteniendo además la antocianina desacilada. También se realizó la oxidación con agua oxigenada que permitió identificar el sacárido unido al HO-3 de la antocianina.

9.4.1.1. *Hidrólisis alcalina*

Cada antocianina acilada en polvo (aprox. 1 mg) fue tratada con hidróxido de sodio 2N, a temperatura ambiente, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno, en ampolla cerrada, para eliminar los grupos acilo. Al cabo de 15 a 40 minutos, según los casos, se acidificó con AcOH. Se obtuvieron la antocianina desacilada y el ácido correspondiente al grupo acilo para cada antocianina acilada, a los cuales se les realizó el análisis espectroscópico y cromatográfico correspondiente. Los componentes de la mezcla se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución analítica.

Se realizó cromatografía en placa delgada (TLC) preparativa en silicagel o gel de sílice para purificar las unidades de acilo antes de la caracterización final mediante TLC analítica comparando con estándares.

9.4.1.2. *Hidrólisis ácida total*

Cada antocianina acilada (2 mg) se calentó a reflujo (aprox. 45-60 minutos) en atmósfera de nitrógeno y oscuridad, con una solución (2,5-3,5 ml) de ácido clorhídrico 2N en etanol (1:1, v/v). El hidrolizado se enfrió y la aglicona se extrajo con alcohol *iso*-amílico, permaneciendo los hidratos de carbono en la fase acuosa.

La fase acuosa resultante en cada caso, fue evaporada a sequedad y el residuo fue derivatizado usando piridina/*N*-(trimetilsilil)imidazol (2:1), calentando a 60°C durante 15 minutos. Los trimetilsilil (TMSi) derivados de las unidades de azúcar se identificaron por **cromatografía gas-líquido** (CGL) en una columna capilar CP-Sil-8-CB (25 m x 0,32 mm D. I.; con 5% de grupos fenilo incorporados al polímero dimetilpolisiloxano, aumentando su polaridad; mejor selectividad para compuestos aromáticos) en comparación con estándares de azúcar auténticos.

El extracto de alcohol *iso*-amílico fue concentrado al vacío; el residuo obtenido (aglicona) se estudió por cromatografía y por ¹H- y ¹³C-RMN para micromuestras.

9.4.1.3. *Hidrólisis ácida parcial*

Se realizó bajo las mismas condiciones que la hidrólisis total, tomando alícuotas cada 5 minutos hasta completar la reacción. Estas alícuotas se estudiaron cromatográficamente.

9.4.1.4. *Oxidación degradativa de las antocianinas con agua oxigenada*

Se utilizó el método de Karrer y de Meuron (1932) modificado por Chandler y Harper (1961) y adaptado por Pomilio y Sproviero (1972 a,b,c). Se disolvió 1 mg de antociana en metanol (0,2 ml) y se agregaron 40 µl de agua oxigenada al 30%. Se dejó cuatro horas a temperatura ambiente, y se descompuso el exceso de oxidante tratando con 3 mg de paladio sobre carbón (Pd 10%) durante 20 horas. Luego, se agregó amoníaco (50 µl) y se calentó (3 minutos) en baño de agua a ebullición. El producto de oxidación se estudió cromatográficamente con los solventes BPA (*n*-butanol, piridina, agua; 9:5:8, en volumen) y BEA (*n*-butanol, etanol 95%, agua; 4:1:5, en volumen; capa superior) y la identificación se realizó empleando la determinación de azúcares ya indicada.

9.4.2. Métodos espectroscópicos

9.4.2.1. *Espectros UV-Vis*

Los espectros de absorción UV y visible de las antocianidinas y de las antocianinas aciladas y sin acilar, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro en solución de HCl-MeOH al 0,01% (de 250 a 600 nm). Los desplazamientos batocrómicos correspondientes al máximo del visible se determinaron agregando a la celda tres gotas de una solución de cloruro de aluminio (AlCl₃) anhidro al 5% (p/v) en metanol.

9.4.2.2. Espectroscopía infrarroja

Los espectros de absorción infrarroja con transformación de Fourier (FT-IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Unicam modelo Mattson Galaxy 3020 (resolución de 2 nm) con programas de análisis de datos Mattson. Las determinaciones se hicieron en pastillas de bromuro de potasio (300 mg). Los valores de número de onda máximo se expresaron en cm^{-1} .

9.4.2.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (^1H -RMN) y de carbono-13 (^{13}C -RMN)

Se midieron en un equipo Bruker 700 (^1H -RMN: 700 MHz; ^{13}C -RMN: 175 MHz) (Universidad de Heidelberg, Alemania Federal) en $\text{DMSO}-d_6$:TFA- d_1 (9:1, en volumen) con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm (δ_{H} y δ_{C}). Los datos de RMN fueron procesados en una estación de trabajo Bruker. Se realizaron espectros mono- (1D-RMN) y bidimensionales (2D-RMN). Se pudieron realizar espectros con 1 mg y menos de muestra, lo cual no fue posible en los equipos Bruker de 200,1 MHz, 500 MHz y 600 MHz para ^1H -RMN en nuestro país.

Se realizaron además espectros bidimensionales para poder establecer la conectividad entre las unidades de aglicona, azúcar y acilo en cada antocianina acilada. También se realizaron los espectros bidimensionales de las antocianinas desaciladas. Se efectuó espectroscopía de correlación (COSY; DFQ-COSY) homonuclear (^1H - ^1H -COSY, *Homonuclear Correlated Spectroscopy*) y heteronuclear (^1H , ^{13}C -COSY, *Heteronuclear Correlated Spectroscopy*) para identificar la unión de los protones entre sí y de cada protón con cada carbono. Ambos tipos de estudios presentan los espectros en ordenada y abscisa y también la proyección en la diagonal. En todos los espectros se usó DQF-COSY que es una modificación de ^1H , ^1H -COSY que requiere mayor tiempo de medición, pero tiene la ventaja de eliminar las señales de protones no acoplados, entre ellos las señales de agua, lo cual ayuda a la resolución de las resonancias de los protones de las unidades de azúcar en esa región del espectro.

También se aplicaron secuencias inversas de pulso en 2D, como es el caso de la correlación de enlaces múltiples heteronucleares o correlación heteronuclear de largo alcance (HMBC, *heteronuclear multiple bond connectivity* o *long-range H,C-COSY*) que da sólo señales de carbonos protonados, permite identificar conectividades H-C a través de dos o más uniones y datos H,C—COSY con miligramos o submiligramos de muestra.

Se realizaron estudios 1D NOE o sea, espectros de diferencia NOE (*difference NOE spectra*), en los cuales se muestra una serie de espectros que representan el efecto sobre el espectro original de la irradiación de protones seleccionados y los correspondientes espectros bidimensionales (NOESY, *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*).

9.4.2.4. Espectrometría de masa (EM)

Se realizaron espectros de masa con ionización suave por bombardeo de átomos rápidos (FAB, *fast atom bombardment*).

9.4.2.5. Cromatografía líquida-espectrometría de masa con ionización por electrospray (ESI, electrospray ionization) (CL-ESI-EM)

Los extractos de *Ipomoea cairica* se separaron en una columna C₁₈ de fase reversa (250 × 4,6 mm; tamaño de partícula: 5 μm) utilizando un cromatógrafo equipado con un detector de longitud de onda variable. La muestra, disuelta en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, se inyectó directamente.

El solvente A fue acetato de amonio 0,02 M, pH 5, y el solvente B fue acetonitrilo. Se usó el siguiente programa: 10 % B durante 4 minutos, luego 18 % B durante 6 minutos, luego un gradiente lineal de 18 % B a 100 % B durante 20 minutos, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. En cada corrida, se inyectó un volumen de 30 μL. El eluido se controló a 250, 295 y 305 nm. El análisis de masa del eluido se realizó con un espectrómetro de masa de cuadrupolo simple en modo de polaridad positiva con un rango de exploración de 700–1000 *m/z*. Los iones se generaron mediante electrospray con un ajuste de voltaje capilar de 5 kV y una temperatura del gas de secado (nitrógeno) de 350°C.

9.5. Características de las antocianinas estudiadas

Los resultados de los tratamientos químicos y los datos espectroscópicos completos de las antocianinas aciladas y desaciladas se encuentran detallados en el Capítulo 4.

Las relaciones $E_{\text{acilo.máx}}/E_{\text{vis.máx}}$ permitieron estimar el número de grupos acilo en cada antocianina acilada. Se obtuvieron valores de $E_{\text{acilo.máx}}/E_{\text{vis.máx}}$ en el rango de 95- 100% para las antocianinas diaciladas **1-5** y valores de $E_{\text{acilo.máx}}/E_{\text{vis.máx}}$ en el rango de 50-65% para las antocianinas monoaciladas **6** y **7**.

Los datos de ¹³C- y ¹H-RMN de las antocianinas aciladas **1**, **2** y **4** y de la antocianina desacilada **8** se enumeran en la **Tabla 4.2.** del Capítulo 4. Los datos de ¹³C- y ¹H-RMN de las antocianinas aciladas **3** y **5** se muestran en la **Tabla 4.3.** del Capítulo 4. Los datos de ¹³C- y ¹H-RMN de las antocianinas aciladas **6** y **7** y de la antocianina desacilada **9** se presentan en la **Tabla 4.4.** del Capítulo 4.

9.6. Ensayo de estabilidad de las antocianinas 1-9

Se estudió la estabilidad de las antocianinas diaciladas (**1-5**) y las antocianinas monoaciladas (**6** y **7**) y su comparación con las antocianinas desaciladas: cianidina-3-*O*-soforósido-5-*O*-glucósido (**8**) y peonidina-3-*O*-soforósido-5-*O*-glucósido (**9**) correspondientes. El estudio de estabilidad se realizó en solución acuosa neutra, en baño termostatzado a 25°C, usando el método de vida media ($t_{1/2}$), definido como el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de color residual. Cada sal de TFA de antocianina se

disolvió en solución buffer de McIlvaine (pH 7,0; citrato 0,1 M – fosfato 0,2 M) para preparar una solución de ensayo de 50 μM , y los espectros en la región del visible (400–700 nm) se midieron automáticamente a intervalos de tiempo apropiados. En base a la absorbancia correspondiente a $\lambda_{\text{vis.máx}}$ de cada espectro, se calculó el color residual (%) como porcentaje de la absorbancia inicial (= 100%).

Con los valores de vida media se realizó el estudio de la cinética de degradación de las antocianinas **1-9**, calculando las constantes de reacción según una cinética de primer orden correspondiente a una degradación o descomposición de un compuesto orgánico, en este caso antociani(di)nas.

9.7. Actividad antioxidante de las antocianinas 1-9: Ensayo de actividad de captación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•])

La actividad de captación de radicales de las antocianinas aciladas **1-7** se ensayó según el método colorimétrico DPPH[•], como hemos visto en el Capítulo 3, y se comparó con la actividad de las antocianinas desaciladas **8** y **9**, α -tocoferol como antioxidante natural y butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante sintético.

Cada muestra se disolvió en EtOH a una concentración de 500 μM . A la solución de la muestra (25 μL) se le agregaron 375 μL de EtOH, 350 μL de solución buffer Tris-HCl (pH 7,4, 0,1 M) y 250 μL de solución DPPH-EtOH 500 μM (para obtener una concentración final de muestra de 12,5 μM), se agitó inmediatamente y se dejó reposar durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

La absorbancia del DPPH[•] residual en la solución de muestra se midió a 520 nm. Las absorbancias inicial y la del blanco se midieron sin sustrato y sin DPPH[•] respectivamente.

La actividad de captación de radicales DPPH[•] (CR%) se calculó como:

$$\text{CR}\% = 100 [(A_i - A_m + A_b)/A_i]$$

Donde: A_i , A_m y A_b se refieren a las absorbancias a 520 nm de las soluciones inicial, de muestra y del blanco respectivamente. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

9.8. Estudio teórico y caracterización del espacio conformacional de antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas

9.8.1. Estudio conformacional

Se llevó a cabo utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT, *Density Functional theory*) (Becke, 2014), implementada en el software Gaussian 09 (Frisch *et al.*,

2009). Se utilizó principalmente el nivel de teoría B3LYP (Becke, 1988, 2014; McLean & Chandler, 1980).

El software gráfico libre ChemSketch (ACDLabs/ChemSketch) se usó para dibujar las estructuras de las antocianidinas que se optimizaron al nivel de teoría B3LYP/6-31G. La re-optimización de las geometrías iniciales se efectuó a un nivel de teoría superior, B3LYP/6-311G++(d,p), que fue empleado en todos los cálculos posteriores.

Las superficies de energía potencial de los compuestos analizados se determinaron mediante escaneos rígidos de 10° para los ángulos diedros de interés (Foresman & Frisch, 2015). Se seleccionaron los conformeros de mínima y máxima energía, que fueron posteriormente optimizados al mismo nivel de teoría (B3LYP/6-311G++(d,p)), con geometrías completamente relajadas.

Se usó el modelo del continuo polarizable (PCM, *Polarizable Continuum Model*) (Miertus & Scrocco, 1981) para evaluar los distintos conformeros en tres solventes (ácido acético, metanol y agua). Se calcularon las frecuencias vibracionales para verificar si las estructuras optimizadas tenían en cuenta los mínimos de energía. Se determinó también la energía del punto cero (ZPE, *Zero-Point Energy*) al mismo nivel de cálculo.

9.9. Análisis topológico y electrónico del espacio conformacional de antocianidinas y su relación con bioactividades

Con las estructuras totalmente optimizadas, se calcularon parámetros geométricos, como: distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros relevantes para el análisis detallado de la estructura geométrica de cada antocianidina en estudio.

Se utilizó la distribución de Maxwell-Boltzmann para calcular los promedios ponderados de cada conformero, lo que permitió determinar su abundancia relativa dentro del espacio conformacional de cada antocianidina.

Se estimaron tanto el momento dipolar aparente (μ^*) como la polarizabilidad molecular ($\langle\alpha\rangle$) para cada conformero y se calculó el promedio ponderado de estas propiedades estructurales en todo el espacio conformacional, empleando la distribución de Maxwell-Boltzmann.

Para el análisis electrónico, se evaluaron los orbitales moleculares de frontera, el orbital ocupado de mayor energía (HOMO) y el orbital desocupado de menor energía (LUMO), así como las diferencias energéticas HOMO-LUMO, junto con la contribución atómica porcentual a estos orbitales. Se determinaron estas propiedades electrónicas en todo el espacio conformacional.

Con el programa NBO 7.0 (Glendening *et al.*, 2018) se calcularon los Orbitales Naturales de Enlace (NBOs), las cargas naturales atómicas, las ocupaciones electrónicas y las transferencias de carga entre orbitales. Por otro lado, el software PROAIM (Biegler-König *et al.*, 1982) permitió el análisis de la topología de los enlaces obteniendo los valores de elipticidad (ϵ). Todos los cálculos se realizaron al mismo nivel de teoría (B3LYP/6-311G++(d,p))

Capítulo 10. Conclusiones generales

En el primer Capítulo de esta Tesis se establecen los fundamentos teóricos sobre las antocianinas, destacando su naturaleza como metabolitos secundarios fenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se presentaron sus funciones biológicas primordiales, como la polinización, la dispersión de semillas y la adaptación a factores de estrés biótico y abiótico, subrayando su papel protector contra la radiación UV y los depredadores. Además, se mencionó su importancia en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica debido a su potencial como colorantes naturales y por su notable actividad antioxidante, la cual se ha asociado con efectos terapéuticos significativos en enfermedades crónicas como las cardiovasculares, la obesidad y la diabetes.

La biosíntesis de las antocianinas, abordada en este capítulo, evidenció la complejidad de los procesos enzimáticos involucrados y la función reguladora de los genes estructurales y transcripcionales. Se destacó la importancia de la vía fenilpropanoide como punto de partida para la síntesis de flavonoides y antocianinas, así como la contribución de factores como la luz, y las hormonas vegetales en la modulación de su acumulación y expresión fenotípica.

Desde el punto de vista estructural, se presentó un análisis detallado de las antocianidinas, enfocándose en su organización molecular basada en un núcleo flavilio caracterizado por su carga positiva, y en la variedad de sustituyentes que modulan sus propiedades físicas y químicas. Se enfatizó el impacto de la glicosilación y la acilación en su estabilidad y funcionalidad, destacando que estas modificaciones afectan directamente su interacción con el entorno y sus aplicaciones tecnológicas.

Asimismo, se resaltó que, a pesar de los avances en la identificación y caracterización de estas moléculas, persisten retos significativos en la estabilización de las antocianinas, dado que factores como el pH, la temperatura y la luz afectan negativamente su integridad química. Esto plantea la necesidad de explorar estrategias innovadoras para maximizar su utilidad en aplicaciones prácticas.

Por esta razón, en el Capítulo 2 se aborda la estabilidad de las antocianinas como un tema central del mismo. La **estabilidad química** de las antocianinas fue identificada como un desafío crucial, ya que estas moléculas son particularmente sensibles a factores ambientales. El análisis demostró que el **pH** es un determinante clave: en condiciones ácidas, las antocianinas predominan en su forma de catión flavilio, que es más estable y responsable de su intensa coloración roja. Al aumentar el pH, el catión flavilio se encuentran en equilibrio con estructuras quinoidales. Sin embargo, en condiciones neutras o alcalinas, las formas quinoidales y carbinol son menos estables y conducen a una pérdida de color. Asimismo, se observó que **la temperatura** y **la luz** aceleran los procesos de degradación, mientras que la presencia de agentes oxidantes puede promover la formación de compuestos intermedios no deseados.

Un aspecto adicional de relevancia fue la **relación entre estructura y coloración**, donde se evidenció que las propiedades ópticas de las antocianinas dependen directamente de su entorno químico. La transición entre formas estructurales (catión flavilio, base quinoidal, carbinol y chalcona) se asocia a cambios espectrales y determina su percepción visual. Este comportamiento es fundamental para su aplicación como colorantes naturales, especialmente en productos sensibles a cambios de pH y temperatura.

Se resaltó además que las modificaciones estructurales, como la **glicosilación** y la **acilación**, desempeñan un papel protector al mejorar la resistencia de las antocianinas a la degradación química y aumentar su solubilidad. En particular, la glicosilación en el anillo C y la acilación con ácidos fenólicos potencian su estabilidad y versatilidad en aplicaciones industriales. Por otro lado, se identificó que los grupos hidroxilo libres en el anillo B, si bien contribuyen a la actividad antioxidante, pueden comprometer la estabilidad en condiciones neutras o básicas debido a la reactividad de estos sitios.

El capítulo también exploró las estrategias para preservar la estabilidad de las antocianinas, como la co-pigmentación. Este efecto permite minimizar la degradación, ampliando el rango de estabilidad del catión flavilio mediante interacciones del tipo autoasociación, interacciones intra- e intermoleculares y complejación con metales.

Otro tema abordado fue la biodisponibilidad de estos compuestos, destacando que, aunque las antocianinas poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas comprobadas, su absorción en el tracto gastrointestinal es limitada, y su metabolismo da lugar a metabolitos activos en bajas concentraciones. Estudios *in vitro* e *in vivo* revelaron que estas moléculas y sus derivados son distribuidos transitoriamente en tejidos clave, como el cerebro y los ojos, aunque en niveles bajos y con una biodisponibilidad influenciada por factores interindividuales como el microbioma intestinal. También se señaló la necesidad de mejorar las metodologías para evaluar con mayor precisión su biodisponibilidad, considerando el costo y la complejidad de los ensayos prolongados.

Se ha vinculado la estabilidad y la biodisponibilidad de las antocianinas con la actividad biológica. La capacidad antioxidante de estas moléculas está estrechamente relacionada con su estructura química y su resistencia a la degradación, factores que influyen directamente en su efectividad frente al estrés oxidativo. Esta transición entre los Capítulos 2 y 3 resalta la importancia de entender cómo los factores químicos y estructurales determinan no sólo la estabilidad y biodisponibilidad, sino también las aplicaciones terapéuticas y funcionales de las antocianinas en la prevención de enfermedades crónicas y su uso en alimentos funcionales y suplementos nutraceuticos.

Se examina la relación entre las antocianinas y su actividad antioxidante, destacando su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que las convierte en compuestos de gran interés para la salud. Se discuten las variaciones en la actividad antioxidante de las antocianidinas y antocianinas según su estructura química, la influencia de grupos funcionales y la importancia de la glicosilación.

Los grupos hidroxilo y metoxilo influyen significativamente en la actividad antioxidante de las antocianinas. La actividad antioxidante y antirradicalaria de estos compuestos está relacionada con sus características estructurales, específicamente el tipo, número y posición de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo. En particular, la estructura *orto*-dihidroxilo (catecol) en el anillo B y los dobles enlaces conjugados son determinantes importantes para la actividad atrapante de radicales de las antocianidinas. Además, la presencia de grupos hidroxilo en posiciones específicas puede afectar la reversibilidad de las reacciones de oxidación, lo que también impacta su capacidad antioxidante.

Las antocianinas potencian la respuesta antioxidante en el organismo a través de varios mecanismos, entre los cuales se destacan:

Estimulación de sistemas de defensa antioxidante: Las antocianinas pueden aumentar la actividad de enzimas antioxidantes endógenas, como la superóxido-dismutasa (SOD) y la glutatión-peroxidasa (GPx), lo que contribuye a una mayor capacidad antioxidante total en las células.

Activación de vías de señalización: Estos compuestos pueden influir en la expresión génica y activar el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2), que es crucial para la regulación de la respuesta antioxidante y la defensa celular contra el estrés oxidativo.

Efectos antiinflamatorios: Las antocianinas también pueden tener propiedades antiinflamatorias, lo que ayuda a reducir el estrés oxidativo asociado con la inflamación.

Estos mecanismos permiten que las antocianinas no sólo actúen como antioxidantes directos, sino que también modulen la respuesta antioxidante del organismo de manera más amplia.

Partiendo de la base de las diferentes características y aspectos de las antocianinas abordados en los primeros tres Capítulos de esta Tesis, se realizó el estudio experimental de antocianinas aciladas complejas presentes en las flores de *Ipomoea cairica* (Capítulo 4). Las etapas de extracción, separación y purificación de estos compuestos proponen grandes desafíos debido a su sensibilidad frente a la luz, oxígeno atmosférico, pH y temperatura, como se ha mencionado en el Capítulo 2. Estas características proponen limitaciones respecto a su manipulación y exigen condiciones rigurosas para su estudio. Otra etapa que presentó un desafío adicional fue la elucidación de las estructuras complejas de las antocianinas aciladas. Se utilizaron tanto métodos químicos (hidrólisis ácida parcial y total, hidrólisis alcalina y oxidación degradativa), como técnicas espectroscópicas (espectros UV-Vis y desplazamientos batocrómicos; ^1H -RMN y ^{13}C -RMN mono- y bidimensional (2D RMN) y espectrometría de masa (EM)).

Se identificaron siete antocianinas aciladas y dos antocianinas desaciladas. Las diferencias estructurales entre las antocianinas aciladas incluyen variaciones en la aglicona y los grupos acilo unidos. Por ejemplo, los compuestos 3 y 5 muestran espectros similares, pero el compuesto 3 produce tanto ácido cafeico como ácido *p*-cumárico tras la hidrólisis, mientras que el compuesto 5 sólo produce ácido cafeico. Además, el compuesto 3 tiene una correlación distintiva entre H-2'' de la Glucosa-B y la señal carbonílica del ácido *p*-cumárico, lo que indica la presencia de un grupo *p*-cumárico, mientras que el compuesto 5 muestra correlaciones relacionadas con un grupo cafeóilo. Además, los compuestos 6 y 7 difieren en que el compuesto 7 contiene peonidina en lugar de cianidina como aglicona, lo que afecta a sus características estructurales. La presencia de diferentes grupos acilo y agliconas contribuye a la diversidad estructural general de estas antocianinas.

Al disponer de estos compuestos aislados, se propuso evaluar la estabilidad de los mismos, considerando los aspectos estructurales que los afectan. Las antocianinas aciladas muestran una mayor estabilidad en soluciones acuosas. Se determinó que las antocianinas diaciladas tienen una vida media más larga en comparación con las antocianinas

monoaciladas y no aciladas. La presencia de dos grupos acilo proporciona protección adicional a la aglicona, creando una interacción hidrofóbica que inhibe los procesos de degradación que conducen a la pérdida de color. Esta mayor estabilidad brinda mayor resistencia a cambios de pH, calor y luz.

También se evaluó la actividad antioxidante de los compuestos aislados, mediante el ensayo de captación de radicales libres por DPPH•.

Al abordar el estudio teórico de las antocianidinas (Capítulo 5) y considerando la escasez de investigaciones previas en la literatura, se evidenció la necesidad de iniciar esta investigación con una caracterización detallada de las antocianidinas más abundantes en la naturaleza: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Esta decisión se justificó en las dificultades experimentales asociadas a su manipulación y caracterización, lo que resaltó la relevancia de un enfoque computacional. Así, se realizó un análisis exhaustivo del espacio conformacional de las antocianidinas hidroxiladas y metoxiladas, compuestos bioactivos reconocidos por sus propiedades antioxidantes.

Inicialmente, se introdujo una nomenclatura estandarizada para identificar y clasificar los conformeros en función de sus disposiciones estructurales, facilitando la descripción y caracterización de los diferentes conformeros. A través de cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT) utilizando el método B3LYP, se optimizaron las estructuras moleculares y se analizó su estabilidad en diferentes solventes. Mediante curvas de energía potencial, se exploró todo el espacio conformacional, identificando dos grupos principales de conformeros: los planos (P) y los no planos (Z). Los resultados mostraron que los conformeros planos presentan una mayor estabilidad que los no planos, y que la estabilidad general de la molécula aumenta con el grado de sustitución en el anillo B. Por ejemplo, pelargonidina, con un único grupo hidroxilo en dicho anillo, mostró menor estabilidad global en comparación con cianidina (dos hidroxilos) o peonidina (un metoxilo y un hidroxilo). Este efecto se intensificó en compuestos trisustituídos, como la delphinidina y la malvidina.

Tras definir los espacios conformacionales en vacío y en diferentes solventes, se avanzó hacia una caracterización topológica y electrónica de las antocianidinas (Capítulo 6). Este análisis incluyó la evaluación de propiedades geométricas (distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros) que permitieron identificar estructuras alejadas de la representación clásica de las antocianidinas como sales de flavilio. En su lugar, se encontró una coexistencia de estructuras de tipo quinoidal cargadas positivamente, junto con estructuras aromáticas asociadas al catión flavilio. En particular, se observó que los conformeros planos (P) tendían a localizar la carga positiva en el oxígeno O-4', mientras que los conformeros no planos (Z) la ubicaban en el oxígeno O-7.

Se caracterizaron propiedades electrónicas fundamentales, como el momento dipolar aparente, la polarizabilidad, las energías de los orbitales de frontera (HOMO-LUMO) y las deslocalizaciones electrónicas en el sistema π . El uso de teorías NBO (*Natural Bond Orbital*) y AIM (*Atoms in Molecules*) permitió un análisis detallado de las cargas naturales atómicas, las transferencias de carga y la elipticidad de los enlaces C-C. Estos estudios confirmaron la presencia predominante de estructuras quinoidales cargadas positivamente, brindando información clave sobre la reactividad de estos compuestos y cómo las diferentes conformaciones modulan dicha reactividad. Se observó, por ejemplo,

una mayor carga positiva localizada en el anillo B de pelargonidina y peonidina, lo que indicaría una menor reactividad de este anillo frente a ataques electrofílicos. Estos hallazgos son consistentes con observaciones experimentales en reacciones realizadas con antocianinas aciladas (Capítulo 4).

El análisis de los orbitales de frontera (HOMO y LUMO) permitió predecir la bioactividad de estos compuestos, identificando sitios reactivos y posibles interacciones π . Los resultados mostraron que la distribución electrónica en los orbitales HOMO y LUMO varía significativamente entre los confórmeros y está influenciada por el grado y tipo de sustitución en los anillos. Asimismo, se evidenció cómo estas propiedades modulan la actividad antioxidante y antimutagénica, estableciendo una conexión entre la estructura molecular, el espacio conformacional y las propiedades biológicas.

En el Capítulo 7, se desarrollaron estudios QSAR para evaluar cuantitativamente la actividad antioxidante, antimutagénica y anticancerígena de diferentes antocianinas. Este enfoque permitió predecir la bioactividad de los compuestos considerando descriptores no conformacionales, una decisión respaldada por la complejidad de los espacios conformacionales de las antocianinas (Capítulo 5). Los modelos QSAR obtenidos demostraron ser herramientas útiles para explicar y predecir propiedades bioactivas dentro de los dominios de aplicabilidad definidos. Estos estudios subrayan la relevancia de los enfoques QSAR en la industria farmacéutica, ya que permiten reducir costos, tiempos de investigación y desafíos asociados a la extracción y manipulación de las antocianinas.

Finalmente, el Capítulo 8 abordó ensayos *in vitro*, *in vivo* y estudios clínicos en humanos, proporcionando evidencia experimental que complementa y valida los hallazgos teóricos y computacionales.

Este enfoque integral permitió establecer una conexión lógica entre los conceptos básicos estructurales y de estabilidad desarrollados en los primeros capítulos y su aplicación en estudios de bioactividad. Desde la caracterización teórica de las antocianinas hasta su evaluación experimental en modelos biológicos, el presente trabajo de Tesis integra de manera coherente múltiples niveles de complejidad, contribuyendo significativamente al entendimiento y aprovechamiento de estos compuestos en contextos químicos, biológicos y farmacéuticos.

Capítulo 11. Referencias

- Abdel-Aziem, A. A., Soliman, E. S., Mosaad, D. M., & Draz, A. H. (2018). Effect of a physiotherapy rehabilitation program on knee osteoarthritis in patients with different pain intensities. *Journal of Physical Therapy Science*, 30(2), 307-312. <https://doi.org/10.1589/jpts.30.307>
- Abdullah, N. H., Kiong, L. S., & Noorbacha, I. A. (2014). QSAR study of flavonoids as Platelet-Activating Factor (PAF) receptor binding antagonists. *Advances in Environmental Biology*, 8(3), 797-802.
- Abubakar, S. M., Ukeyima, M. T., Spencer, J. P. E., & Lovegrove, J. A. (2019). Acute effects of Hibiscus sabdariffa calyces on postprandial blood pressure, vascular function, blood lipids, biomarkers of insulin resistance and inflammation in humans. *Nutrients*, 11(2), 341. <https://doi.org/10.3390/nu11020341>
- Abugri, D. A., Witola, W. H., Jaynes, J. M., & Toufic, N. (2016). In vitro activity of Sorghum bicolor extracts, 3-deoxyanthocyanidins, against Toxoplasma gondii. *Experimental Parasitology*, 164, 12-19.
- ACDLabs/ChemSketch. (n.d.). <https://www.acdlabs.com>
- Afaq, F., Syed, D. N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M. H., Khan, N., Zaid, M. A., & Mukhtar, H. (2007). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(1), 222-232.
- Aghaei, M., Mirzaei, M., Ghanadian, M., et al. (2021). 6-Methoxylated flavonoids: Jacein, and 3-demethyljacein from Centaurea schmidii with their endoplasmic reticulum stress and apoptotic cell death in breast cancer cells along with in-silico analysis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20, 417-432. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2020.113895.14548>
- Ahbirami, R., Zuharah, W. F., Yahaya, Z. S., Dieng, H., Thiagaletchumi, M., Fadzly, N., Ahmad, A. H., & Abu Bakar, S. (2014a). Oviposition deterring and oviciding potentials of Ipomoea cairica L. leaf extract against dengue vectors. *Tropical Biomedicine*, 31, 456-465.
- Ahbirami, R., Zuharah, W. F., Thiagaletchumi, M., Subramaniam, S., & Sundarasekar, J. (2014b). Larvicidal efficacy of different plant parts of railway creeper, Ipomoea cairica extract against dengue vector mosquitoes, Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) and Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 14, 180.
- Ahmed, S., Wang, N., Bin Hafeez, B., Cheruvu, V. K., & Haqqi, T. M. (2005). Punica granatum L. extract inhibits IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes in vitro. *Journal of Nutrition*, 135(9), 2096-2102. <https://doi.org/10.1093/jn/135.9.2096>
- Ait-Oufella, H., Libby, P., & Tedgui, A. (2019). Anticytokine immune therapy and atherothrombotic cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(8), 1510-1519. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.311998>
- Akagi, T., Ikegami, A., Tsujimoto, T., Kobayashi, S., Sato, A., Kono, A., & Yonemori, K. (2009). DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit. *Plant Physiology*, 151(4), 2028-2045.
- Ali, H. M., & Ali, I. H. (2015). QSAR and mechanisms of radical scavenging activity of phenolic and anilinic compounds using structural, electronic, kinetic, and thermodynamic parameters. *Medicinal Chemistry Research*, 24, 987-998.

- Ali, H. M., Almagribi, W., & Al-Rashidi, M. N. (2016). Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure–activity relationship and synthesis. *Food Chemistry*, *194*, 1275-1282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.003>
- Ali, T., Kim, T., Rehman, S. U., Khan, M. S., Amin, F. U., Khan, M., Ikram, M., & Kim, M. O. (2017). Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0798-6>
- Ali, H. M., & Ali, I. H. (2017). A DFT and QSAR study of the role of hydroxyl group, charge and unpaired-electron distribution in anthocyanidin radical stabilization and antioxidant activity. *Medicinal Chemistry Research*, *26*, 2666-2674. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1964-0>
- Ali, H. M., & Ali, I. H. (2018). Energetic and electronic computation of the two-hydrogen atom donation process in catecholic and non-catecholic anthocyanidins. *Food Chemistry*, *243*, 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.120>
- Aliaño-González, M. J., Ferreiro-González, M., Espada-Bellido, E., Carrera, C., Palma, M., Álvarez, J. A., Ayuso, J., & Barbero, G. F. (2020). Extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) using an experimental design methodology. Part 1: Pressurized liquid extraction. *Agronomy*, *10*(2), 183.
- Alqurashi, R. M., Galante, L. A., Rowland, I. R., Spencer, J. P. E., & Commane, D. M. (2016). Consumption of a flavonoid-rich açai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men. *American Journal of Clinical Nutrition*, *104*(5), 1227-1235. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.128728>
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Busco, F., Quiles, J. L., Cordero, M. D., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(3), 289–294.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(17), 7915–7922.
- Amogne, N. Y., Ayele, D. W., & Tsigie, Y. A. (2020). Recent advances in anthocyanin dyes extracted from plants for dye sensitized solar cell. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*, *9*, 23.
- Andersen, Ø. M., & Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. En Ø. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (2nd ed., pp. 452-471). CRC Press.
- Andersen, Ø. M., & Markham, K. R. (Eds.). (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press.
- Andersen, Ø. M., & Jordheim, M. (2010). Chemistry of Flavonoid-Based Colors in Plants. En *Comprehensive Natural Products II* (Vol. 3, pp. 547-614). Elsevier.
- Anouar, E. H., Zakaria, N. S. S., Alsalme, A., & Shah, S. A. A. (2015). α -Glucosidase activity of oleanolic acid and its oxidative metabolites: DFT and Docking studies. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *15*, 1148-1158.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, *125*(5), 989-1009.

- Aparicio, S. (2010). A systematic computational study on flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2017-2038. <https://doi.org/10.3390/ijms11052017>
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelil, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., & Bener, M. (2010). Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for antioxidants in human serum and for hydroxyl radical scavengers. *Methods in Molecular Biology*, 594, 215-239.
- Aprodu, I., Milea, Ş. A., Enachi, E., Râpeanu, G., Bahrim, G., & Stănciuc, N. (2020). Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from purple maize flour extract and the effect of heating on selected biological functionality. *Foods*, 9, 1593.
- Aramwit, P., Bang, N., & Srichana, T. (2010). The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Research International*, 43(4), 1093-1097.
- Aranda, J. F., Garro Martinez, J. C., Castro, E. A., & Duchowicz, P. R. (2016). Conformation-independent QSPR approach for the soil sorption coefficient of heterogeneous compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1247-1255.
- Aranha, L. N., Gomes Silva, M., Uehara, S. K., Raggio Luiz, R., Nogueira Neto, J. F., Rosa, G., & Moraes de Oliveira, G. M. (2020). Effects of a hypoenergetic diet associated with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp consumption on antioxidant status, oxidative stress and inflammatory biomarkers in overweight, dyslipidemic individuals. *Clinical Nutrition*, 39(5), 1464-1469. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.06.008>
- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11, 1139-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88467-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88467-8)
- Asgary, S., Kelishadi, R., Rafieian-Kopaei, M., Najafi, S., Najafi, M., & Sahebkar, A. (2013). Investigation of the lipid-modifying and antiinflammatory effects of *Cornus mas* L. supplementation on dyslipidemic children and adolescents. *Pediatric Cardiology*, 34(7), 1729-1735. <https://doi.org/10.1007/s00246-013-0693-5>
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., & others. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23(3), 423-433.
- Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. (2015). Molecular docking and 3D-QSAR-based virtual screening of flavonoids as potential aromatase inhibitors against estrogen-dependent breast cancer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(4), 804-819.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2004). Properties of 3-deoxyanthocyanins from sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4388-4394.
- Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., Fernandes, A., de Freitas, V., & Mateus, N. (2010). Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chemistry*, 119(2), 518-523.
- Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Ichianagi, T., Takeuchi, A., Saito, T., & Fukuoka, H. (2008). Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10154-10159.
- Bader, R. F. W. (1990). *Atoms in molecules: A quantum theory*. Oxford University Press.

- Bader, R. F. W. (1998). A bond path: A universal indicator of bonded interactions. *Journal of Physical Chemistry A*, *102*, 7314-7323. <https://doi.org/10.1021/jp981794v>
- Bader, R. F. W. (2009). Bond paths are not chemical bonds. *Journal of Physical Chemistry A*, *113*, 10391-10396. <https://doi.org/10.1021/jp906341r>
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Bagchi, B. J., Balmoori, J., & others. (1998). Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology*, *30*(5), 771-776.
- Bagchi, D., Sen, C. K., Bagchi, M., & Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)*, *69*(1), 75–80.
- Bahari, H., Rafiei, H., Goudarzi, K., Omidian, K., Asbaghi, O., Kolbadi, K. S. H., Naderian, M., & Hosseini, A. (2023). The effects of pomegranate consumption on inflammatory and oxidative stress biomarkers in adults: A systematic review and meta-analysis. *Inflammopharmacology*, *31*(6), 2283-2301.
- Bąkowska, A., Kucharska, A. Z., & Oszmiański, J. (2003). The effect of heating, UV irradiation, and storage stability of anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, *81*, 349-355.
- Bąkowska-Barczak, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *14/55*(2), 107–116.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, *99*(1), 191-203.
- Bao, T., Li, Y., Xie, J., Sun, C., Li, X., Pu, Y., & Chen, W. (2018). Systematic evaluation of bioactive components and antioxidant capacity of some new and common bayberry cultivars using an in vitro gastrointestinal digestion method. *Food Research International*, *103*, 326-334.
- Barkat, M. A., Rizwanullah, M., Naim, J., Pottoo, F. H., & Kumar, R. (2014). Phytoconstituents as potential anti-HIV agents: A systematic review. *International Journal of Biomedical Research*, *5*, 299-313.
- Basílio, N., & Pina, F. (2016). Chemistry and photochemistry of anthocyanins and related compounds: A thermodynamic and kinetic approach. *Molecules*, *21*. <https://doi.org/10.3390/molecules21111502>
- Basu, A., Betts, N. M., Nguyen, A., Newman, E. D., Fu, D., & Lyons, T. J. (2014). Freeze-dried strawberries lower serum cholesterol and lipid peroxidation in adults with abdominal adiposity and elevated serum lipids. *Journal of Nutrition*, *144*(6), 830-837. <https://doi.org/10.3945/jn.113.188169>
- Basu, A., Kurien, B. T., Tran, H., Byrd, B., Maher, J., Schell, J., Masek, E., Barrett, J. R., Lyons, T. J., Betts, N. M., et al. (2018). Strawberries decrease circulating levels of tumor necrosis factor and lipid peroxides in obese adults with knee osteoarthritis. *Food & Function*, *9*(12), 6218-6226. <https://doi.org/10.1039/c8fo01194j>
- Basu, A., Schell, J., & Scofield, R. H. (2018). Dietary fruits and arthritis. *Food & Function*, *9*(1), 70-77. <https://doi.org/10.1039/c7fo01435j>
- Becke, A. D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*, *38*, 3098-3100.

- Becke, A. D. (2014). Perspective: Fifty years of density-functional theory in chemical physics. *Journal of Chemical Physics*, 140, 18A301. <https://doi.org/10.1063/1.4869598>
- Behl, T., Kumar, K., Singh, S., Sehgal, A., Sachdeva, M., Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Buhas, C., Judea-Pusta, C. T., et al. (2021). Unveiling the role of polyphenols in diabetic retinopathy. *Journal of Functional Foods*, 85, 104608. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104608>
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I. D., Venskutonis, P. R., Georgiev, M., Clément, C., & others. (2020). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: recent biotechnological advances. *Biotechnology Advances*, 43, 107600.
- Bendokas, V., Skemiene, K., Trumbeckaite, S., Stanys, V., Passamonti, S., Borutaite, V., & Liobikas, J. (2019). Anthocyanins: from plant pigments to health benefits at mitochondrial level. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), 3352-3365.
- Bentz, E. N., Jubert, A. H., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. (2010). Theoretical study of Z isomers of A-type dimeric proanthocyanidins substituted with R=H, OH and OCH₃: Stability and reactivity properties. *Journal of Molecular Modeling*, 16, 1895-1909. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0682-z>
- Bentz, E. N., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. (2014a). Structure and electronic properties of (+)-catechin: Aqueous solvent effects. *Journal of Molecular Modeling*, 20, 2105-2118. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2105-z>
- Bentz, E. N., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. (2014b). Exploratory conformational study of (+)-catechin: Modeling of the polarizability and electric dipole moment. *Journal of Molecular Modeling*, 20, 2522. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2522-z>
- Bentz, E. N., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. (2016). Z-Isomers of (4 α →6'', 2 α →0→1'')-phenylflavan substituted with R' = R = OH. Conformational properties, electronic structure and aqueous solvent effects. *Journal of Molecular Modeling*, 22, 187. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3034-9>
- Bentz, E. N., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. (2017). Donor-acceptor interactions as descriptors of the free radical scavenging ability of flavans and catechin. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1110, 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2017.03.028>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bi, X., Zhang, J., Chen, C., Zhang, D., Li, P., & Ma, F. (2014). Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food Chemistry*, 152, 205-209.
- Biegler-König, F. W., Bader, R. F. W., & Tang, T. H. (1982). Calculation of the average properties of atoms in molecules II. *Journal of Computational Chemistry*, 3, 317-328.
- Biegler-König, F., Bader, R. F.W., Tang, T. H. (1982) Calculation of the average properties of atoms in molecules II. *Journal of Computational Chemistry*, 3, 317-328
- Biegler-König, F., Schönbohm, J., & Bayles, D. (2001). AIM2000. *Journal of Computational Chemistry*, 22, 545-559.
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197(Pt A), 39-46.
- Bishayee, A., Haskell, Y., Do, C., Siveen, K. S., Mohandas, N., Sethi, G., & Stoner, G. D. (2016). Potential benefits of edible berries in the management of aerodigestive and gastrointestinal tract

cancers: Preclinical and clinical evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1753–1775.

- Bobe, G., Wang, B., Seeram, N. P., Nair, M. G., & Bourquin, L. D. (2006). Dietary anthocyanin-rich tart cherry extract inhibits intestinal tumorigenesis in APC (Min) mice fed suboptimal levels of sulindac. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9322–9328.
- Bokelmann, J. M. (2021). Passionflower (*Passiflora incarnata*): (flowering vine). In J. M. Bokelmann (Ed.), *Medicinal Herbs in Primary Care: An Evidence-Guided Reference for Healthcare Providers* (1st ed., pp. 515-522). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-84676-9.00063-5>
- Borkowski, T., Szymusiak, H., Gliszczyńska-Świątło, A., & Tyrakowska, B. (2005). The effect of 3-O- β -glucosylation on structural transformations of anthocyanidins. *Food Research International*, 38, 1031-1037.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990a). Radical chemistry of flavonoid antioxidants. En I. Emerit, L. Packer, & C. Auclair (Eds.), *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine* (pp. 165-169). Plenum Press.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990b). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. En L. Packer & A. N. Glazer (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 186, pp. 343-355). Academic Press.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67–87.
- Bovell-Benjamin, A. C. (2007). Sweet potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 1-59.
- Boveris, A. D., Galatro, A., Sambrotta, L., Ricco, R., Gurni, A. A., & Puntarulo, S. (2001). Antioxidant capacity of a 3-deoxyanthocyanidin from soybean. *Phytochemistry*, 58(7), 1097-1105.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 554–560.
- Burgos-Vargas, R., Cardiel, M. H., Loyola-Sánchez, A., Mendes De Abreu, M., Pons-Estel, B. A., Rossignol, M., Avouac, B., Bosi Ferraz, M., & Halhol, H. (2014). Characterization of knee osteoarthritis in Latin America. A comparative analysis of clinical and health care utilization in Argentina, Brazil, and Mexico. *Reumatología Clínica (English Edition)*, 10(3), 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2013.07.013>
- Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40.
- Brainina, K., Stozhko, N., & Vidrevich, M. (2019). Antioxidants: terminology, methods, and future considerations. *Antioxidants*, 8(12), 297.
- Brannen, A. L. (2001). *Food additives* (2nd ed.). Marcel Dekker Incorporated.
- Brasileiro, B. G., Pizziolo, V. R., Raslan, D. S., Jamal, C. M., & Silveira, D. (2006). Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 195-202.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D., & Murray, T. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study. *The Lancet Oncology*, 13(8), 790-801. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70211-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70211-5)

- Brooks, M. S.-L., & Celli, G. B. (2019). *Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health*. Royal Society of Chemistry.
- Brouillard, R., & Dubois, J. E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359–1364. <https://doi.org/10.1021/ja00447a012>
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. In *Anthocyanins As Food Colors* (pp. 1-40).
- Brouillard, R. (1983) The *in vivo* expression of anthocyanins colour in plants. *Phytochemistry*, 22, 1311-1323.
- Brouillard, R., Chassaing, S., & Fougerousse, A. (2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry*, 64(7), 1179-1186.
- Brown, J. E., & Kelly, M. F. (2007). Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(1), 66-71.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2002). *Biochemistry and molecular biology of plants* (pp. 1367). Wiley.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68(1), 101–107.
- Cacelli, I., Ferretti, A., & Prampolini, G. (2016). Predicting light absorption properties of anthocyanidins in solution: A multi-level computational approach. *Theoretical Chemistry Accounts*, 135, 156. <https://doi.org/10.1007/s00214-016-1911-z>
- Cameira-dos Santos, P. J., Brillouet, J. M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Detection and partial characterisation of new anthocyanin-derived pigments in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 204-208.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311.
- Cao, Z., Huang, S., Dou, C., Xiang, Q., & Dong, S. (2018). Cyanidin suppresses autophagic activity regulating chondrocyte hypertrophic differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2332-2342. <https://doi.org/10.1002/jcp.26105>
- Carbó-Dorca, R., Robert, D., Amat, L. I., Jirones, X., & Besalú, E. (2000). *Molecular Quantum Similarity in QSAR and Drug Research*. Springer-Verlag.
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Cásedas, G., Les, F., & López, V. (2020). Anthocyanins: plant pigments, food ingredients or therapeutic agents for the CNS? A mini-review focused on clinical trials. *Current Pharmaceutical Design*, 26(16), 1790-1798. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200127093701>
- Castañeda-Ovando, M., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Anthocyanins in food: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011) Non-Thermal Stabilization Mechanisms of Anthocyanins in Model and Food Systems: An Overview. *Food Research International*, 44, 499-509.

- Cerletti, A., de Curtis, A., Bracone, F., Digesu, C., Morganti, A. G., Iacoviello, L., de Gaetano, G., & Donati, M. B. (2017). Dietary anthocyanins and health: Data from FLORA and ATHENA EU projects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *83*, 103–106.
- Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, *86*(1), 69-77.
- Chai, S. C., Davis, K., Zhang, Z., Zha, L., & Kirschner, K. F. (2019). Effects of tart cherry juice on biomarkers of inflammation and oxidative stress in older adults. *Nutrients*, *11*(2), 228. <https://doi.org/10.3390/nu11020228>
- Chandler, B. V., & Harper, K. A. (1961) Identification of saccharides in anthocyanins and other flavonoids. *Aust. J. Chem.* *14*(4), 586-595.
- Chao, W. W., Chung, Y. C., Shih, I. P., Wang, H. Y., Chou, S. T., & Hsu, C. K. (2015). Red bean extract inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and H₂O₂-induced oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Medicinal Food*, *18*(7), 724-730. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3353>
- Charron, C. S., Kurilich, A. C., Clevidence, B. A., Simon, P. W., Harrison, D. J., Britz, S. J., Baer, D. J., & Novotny, J. A. (2009). Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: Effects of acylation and plant matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(3), 1226-1230.
- Chaudhry, Q., Chrétien, J., Craciun, M., Guo, G., Lemke, F., Müller, J.-A., Neagu, D., Piclin, N., Pintore, M., & Trundle, P. (2007). Algorithms for (Q)SAR model building. En E. Benfenati (Ed.), *Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) for Pesticide Regulatory Purposes* (pp. 111-147). Elsevier.
- Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., & Wang, J. (1996). Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, *79*(2), 157-163.
- Chen, H., Yu, W., Chen, G., Meng, S., Xiang, Z., & He, N. (2017a). Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. *Molecules*, *23*(4).
- Chen, Y., Li, Q., Zhao, T., Zhang, Z., Mao, G., Feng, W., Wu, X., & Yang, L. (2017b). Biotransformation and metabolism of three mulberry anthocyanin monomers by rat gut microflora. *Food Chemistry*, *237*, 887-894.
- Chen, Z., Wang, C., Pan, Y., Gao, X., & Chen, H. (2018). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of anthocyanins extract from black soybean seed coat in high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *Food & Function*, *9*(2), 426–439.
- Chen, J., Liu, A., Zhou, Q., Yu, W., Guo, T., Jia, Y., Yang, K., Niu, P., & Feng, H. (2021a). Acupuncture for the treatment of knee osteoarthritis: An overview of systematic reviews. *International Journal of General Medicine*, *14*, 8481-8494. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S342435>
- Chen, X., Zhang, W., & Xu, X. (2021b). Cyanidin-3-glucoside suppresses the progression of lung adenocarcinoma by downregulating TP53I3 and inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. *World Journal of Surgical Oncology*, *19*(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02339-7>
- Cheng, S., Wu, T., Gao, J., Han, X., Huang, W., You, Y., & Zhan, J. (2023). Color myth: Anthocyanins reactions and enological approaches achieving their stabilization in the aging process of red wine. *Food Innovation and Advances*, *2*(4), 255-271.

- Chew, B., Mathison, B., Kimble, L., McKay, D., Kaspar, K., Khoo, C. Y. O., Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. (2019). Chronic consumption of a low calorie, high polyphenol cranberry beverage attenuates inflammation and improves glucoregulation and HDL cholesterol in healthy overweight humans: A randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, *58*(3), 1223-1235. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1643-z>
- Cheynier, V., Tomas-Barberán, F. A., & Yoshida, K. (2015). Polyphenols: From plants to a variety of food and nonfood uses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(35), 7589–7594.
- Chirico, N., & Gramatica, P. (2012). Real external predictivity of QSAR models. Part 2. New intercomparable thresholds for different validation criteria and the need for scatter plot inspection. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *52*(8), 2044-2058. <https://doi.org/10.1021/ci300084j>
- Christensen, R., Tarp, S., Altman, R. D., Henriksen, M., Bartels, E. M., Klokke, L., Boesen, M., Furst, D. E., Holm, C. C., Danneskiold-Samsøe, B., et al. (2014). Comparing different preparations and doses of rosehip powder in patients with osteoarthritis of the knee: An exploratory randomized active-controlled trial. *International Journal of Clinical Rheumatology*, *9*(3), 267-278. <https://doi.org/10.2217/ijr.14.13>
- Cho, M. K., Jang, Y. P., Kim, Y. C., & Kim, S. G. (2004). Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: The role in TNF-alpha inhibition. *International Immunopharmacology*, *4*(10-11), 1419-1429.
- Chorfa, N., Savard, S., & Belkacemi, K. (2016). An efficient method for high-purity anthocyanin isomers isolation from wild blueberries and their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, *197*(Pt B), 1226-1234.
- Chou, P.-H., Matsui, S., Misaki, K., & Matsuda, T. (2007). Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater. *Environmental Science & Technology*, *41*(2), 652-657.
- Christofi, S., Malliaris, D., Katsaros, G., Panagou, E., & Kallithraka, S. (2020). Limit SO2 content of wines by applying High Hydrostatic Pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *62*, 102342.
- Chrubasik-Hausmann, S., Chrubasik, C., Neumann, E., & Müller-Ladner, U. (2014). A pilot study on the effectiveness of a rose hip shell powder in patients suffering from chronic musculoskeletal pain. *Phytotherapy Research*, *28*(11), 1720-1726. <https://doi.org/10.1002/ptr.5192>
- Chrubasik, C., Wiesner, L., Black, A., Müller-Ladner, U., & Chrubasik, S. (2008). A one-year survey on the use of a powder from *Rosa canina* Lito in acute exacerbations of chronic pain. *Phytotherapy Research*, *22*(9), 1141-1148. <https://doi.org/10.1002/ptr.2352>
- Chuntakaruk, H., Kongtawelert, P., & Pothacharoen, P. (2021). Chondroprotective effects of purple corn anthocyanins on advanced glycation end products induction through suppression of NF-κB and MAPK signaling. *Scientific Reports*, *11*(1), 1895. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81384-4>
- Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. B. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural Product Communications*, *6*(1), 149-156.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1063–1072.
- Consonni, V., & Todeschini, R. (2010). Structure-Activity Relationships by Autocorrelation Descriptors and Genetic Algorithms. En H. Lodhi & Y. Yamanishi (Eds.), *Chemoinformatics and*

Advanced Machine Learning Perspectives: Complex Computational Methods and Collaborative Techniques (pp. 60-93). IGI Global.

- Cooper-Driver, G. A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56(3), 229-236.
- Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez De Mejia, E. (2017). Natural pigments: Stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180-198.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 569-590.
- Cronin, M. T. (2010). Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs)-applications and methodology. En T. Puzyn, J. Leszczynski, & M. T. Cronin (Eds.), *Recent Advances in QSAR Studies* (pp. 3-11). Springer.
- da Costa, C. T., Nelson, B. C., Margolis, S. A., & Horton, D. (1998). Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), 321-327.
- da Costa, C. T., Horton, D., & Margolis, S. A. (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 403-410.
- da Costa, B. R., Pereira, T. V., Saadat, P., Rudnicki, M., Iskander, S. M., Bodmer, N. S., Bobos, P., Gao, L., Kiyomoto, H. D., Montezuma, T., et al. (2021). Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: Network meta-analysis. *British Medical Journal*, 375, n2321. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2321>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dai, T., Shi, K., Chen, G., Shen, Y., & Pan, T. (2017). Malvidin attenuates pain and inflammation in rats with osteoarthritis by suppressing NF- κ B signaling pathway. *Inflammation Research*, 66(12), 1075-1084. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1087-6>
- Dale, C. E., Fatemifar, G., Palmer, T. M., White, J., Prieto-Merino, D., Zabaneh, D., Engmann, J. E. L., Shah, T., Wong, A., Warren, H. R., et al. (2017). Causal associations of adiposity and body fat distribution with coronary heart disease, stroke subtypes, and type 2 diabetes mellitus: A mendelian randomization analysis. *Circulation*, 135(24), 2373-2388. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026560>
- Damar, I., & Ekşi, A. (2012). Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Chemistry*, 135(4), 2910-2914. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.032>
- Dangles, O., & Brouillard, R. (1992). Polyphenol interactions. The copigmentation case: Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. *Canadian Journal of Chemistry*, 70(8), 2174-2189.
- Dangles, O., Brouillard, R., & Saito, N. (1993). Kinetic and thermodynamic control of flavylium hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *pharbitis nil*. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 3125-3132. <https://doi.org/10.1021/ja00061a011>
- Dangles, O., & Fenger, J. A. (2018). The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23081970>

- Das, S., Mitra, I., Batuta, S., Niharul Alam, M., Roy, K., & Begum, N. A. (2014). Design, synthesis and exploring the quantitative structure-activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *24*(22), 5050-5054.
- Davies, A. J., & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(5), 716–720.
- Davinelli, S., Bertoglio, J. C., Zarrelli, A., Pina, R., & Scapagnini, G. (2015). A randomized clinical trial evaluating the efficacy of an anthocyanin–maqui berry extract (Delphinol®) on oxidative stress biomarkers. *Journal of the American College of Nutrition*, *34*(Suppl. 1), 28-33. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1080108>
- de la Rosa Reyna, X. F., Garcia León, I., Hernández Mendoza, J., Morales Baquera, J., & Di Carlo Quiroz Velásquez, J. (2022). Antocianinas, propiedades funcionales y potenciales aplicaciones terapéuticas. *Revista Boliviana de Química*, *39*(5), 155-163.
- de Lima, A. A., Sussuchi, E. M., & De Giovanni, W. F. (2007). Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. *Croatica Chemica Acta*, *80*(1), 29-34.
- De Lorenzo, A., Gratteri, S., Gualtieri, P., Cammarano, A., Bertucci, P., & Di Renzo, L. (2019). Why primary obesity is a disease? *Journal of Translational Medicine*, *17*(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1919-y>
- De Masi, L., Bontempo, P., Rigano, D., Stiuso, P., Carafa, V., Nebbioso, A., Piacente, S., Montoro, P., Aversano, R., D'Amelia, V., et al. (2020). Comparative phytochemical characterization, genetic profile, and antiproliferative activity of polyphenol-rich extracts from pigmented tubers of different *Solanum tuberosum* varieties. *Molecules*, *25*(1), 233. <https://doi.org/10.3390/molecules25010233>
- de Pascual-Teresa, S., & Sanchez-Ballesta, M. T. (2008). Anthocyanins: From plant to health. *Phytochemical Reviews*, *7*(2), 281-299.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R., & Paredes-Lopez, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(3), 173-289.
- DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., et al. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(6), 438-451. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>
- Deveza, L., & Hunter, D. (2016). An update on the treatment of osteoarthritis in obese patients. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *17*(6), 753-755. <https://doi.org/10.1517/14656566.2016.1165208>
- Dey, P. M., & Harborne, J. B. (1993). 1. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2nd printing). Londres: Academic Press Limited. pp. 326-341.
- Deylami, M. Z., Rahman, R. A., Tan, C. P., Bakar, J., & Olusegun, L. (2016). Effect of blanching on enzyme activity, color changes, anthocyanin stability and extractability of mangosteen pericarp: A kinetic study. *Journal of Food Engineering*, *178*, 12-19.
- Di Stefano, V., Pitonzo, R., Novara, M. E., Bongiorno, D., Indelicato, S., Gentile, C., Avellone, G., Bognanni, R., Scandurra, S., & Melilli, M. G. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition in pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes from south Italy by UHPLC–Orbitrap-MS approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(3), 1038-1045. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9270>
- Diaconeasa, Z., Ayvaz, H., Ruginǎ, D., Leopold, L. F., Stǎnilǎ, A., Socaciu, C., Tǎbǎran, F., Luput, L., Mada, D. C., Pinteaa, A., et al. (2017). Melanoma inhibition by anthocyanins is associated with the reduction of oxidative stress biomarkers and changes in mitochondrial membrane potential. *Plant Foods for Human Nutrition*, *72*(4), 404-410.

- Dimitrić Marković, J. M., Pejin, B., Milenković, D., Amić, D., Begović, N., Mojović, M., & Marković, Z. S. (2017). Antiradical activity of delphinidin, pelargonidin and malvin towards hydroxyl and nitric oxide radicals: The energy requirements calculations as a prediction of the possible antiradical mechanisms. *Food Chemistry*, 218, 440-446. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.106>
- Djeradi, H., Rahmouni, A., & Cheriti, A. (2014). Antioxidant activity of flavonoids: A QSAR modeling using Fukui indices descriptors. *Journal of Molecular Modeling*, 20(8), 2476.
- Dominikowska, J., & Palusiak, M. (2012). The new aromaticity measure based on one-electron density function. *Structural Chemistry*, 23, 1173-1183. <https://doi.org/10.1007/s11224-011-9941-6>
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., & Sand, P. G. (2008). Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(12), 1428-1433. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800043>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Drummer, D., McAdam, J., Seay, R., Ferrando, A., Bridges, S. L. Jr., Singh, J. A., & Bamman, M. (2021). Osteoarthritis progression: mitigation and rehabilitation strategies. *Frontiers in Rehabilitation Sciences*, 2, 724052. <https://doi.org/10.3389/fresc.2021.724052>
- Du, H., Lai, L., Wang, F., Sun, W., Zhang, L., Li, X., Wang, L., Jiang, L., & Zheng, Y. (2018). Characterisation of flower colouration in 30 *Rhododendron* species via anthocyanin and flavonol identification and quantitative traits. *Plant Biology (Stuttgart)*, 20, 121-129.
- Du, C., Smith, A., Avalos, M., South, S., Crabtree, K., Wang, W., Kwon, Y. H., Vijayagopal, P., & Juma, S. (2019a). Blueberries improve pain, gait performance, and inflammation in individuals with symptomatic knee osteoarthritis. *Nutrients*, 11(2), 290. <https://doi.org/10.3390/nu11020290>
- Du, C., Smith, A., Avalos, M., South, S., Crabtree, K., Wang, W., Kwon, Y. H., Vijayagopal, P., & Juma, S. (2019b). Whole blueberries improve pain, functionality, inflammation and cartilage metabolism in individuals with symptomatic knee osteoarthritis (FS15-03-19). *Current Developments in Nutrition*, 3(Suppl. 1), nzz031.FS15-03-19. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz031.FS15-03-19>
- Duarte, L. J., Chaves, V. C., Nascimento, M. V. P. D. S., Calvete, E., Li, M., Ciralo, E., Ghigo, A., Hirsch, E., Simões, C. M. O., Reginatto, F. H., & Dalmarco, E. M. (2018). Molecular mechanism of action of pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. *Food Chemistry*, 247, 56-65.
- Duchowicz, P. R., Castro, E. A., & Fernández, F. M. (2006). Alternative algorithm for the search of an optimal set of descriptors in QSAR-QSPR studies. *Match*, 55(1), 179-192.
- Duchowicz, P. R., Fioressi, S. E., Bacelo, D. E., Saavedra, L. M., Toropova, A. P., & Toropov, A. A. (2015). QSPR studies on refractive indices of structurally heterogeneous polymers. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 140, 86-91.
- Dudek, A., Spiegel, M., Strugała-Danak, P., & Gabrielska, J. (2022). Analytical and theoretical studies of antioxidant properties of chosen anthocyanins; a structure-dependent relationships. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5432.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using

DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.

– Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytotherapy Research*, 30(9), 1379-1391.

– Eich, E., Pertz, H., Kaloga, M., Schulz, J., Fesen, M. R., Mazumder, A., & Pommier, Y. (1996). (-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(1), 86-95.

– Eich, E. (2008). *Solanaceae and Convolvulaceae - Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economical Significance*. Springer.

– Einbond, L. S., Reynertson, K. A., Luo, X.-D., Basile, M. J., & Kenelli, E. J. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84(1), 23-28.

– Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461-7466.

– Ekanayake, P., Kooh, M. R., Thotagamuge, R., Lim, A., Petra, M. I., Voo, N. Y., & Lim, C. M. (2013). Combined experimental and DFT-TDDFT study of photo-active constituents of *Canarium odontophyllum* for DSSC application. *Chemical Physics Letters*, 585, 121-127.

– Eker, M. E., Aaby, K., Budic-Leto, I., Rimac Brnčić, S., El, S. N., Karakaya, S., Simsek, S., Manach, C., Wiczowski, W., & de Pascual-Teresa, S. (2019). A review of factors affecting anthocyanin bioavailability: Possible implications for the inter-individual variability. *Foods*, 9(1), 2.

– Elfaki, I., Mir, R., Almutairi, F. M., & Abu Duhier, F. M. A. (2018). Cytochrome P450: Polymorphisms and roles in cancer, diabetes and atherosclerosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19, 2057-2070. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.8.2057>

– Enaru, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., & Wang, J. (1996). Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, 79(2), 157-163.

– Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants (Basel)*, 10(12), 1967.

– Eriksson, L., Jaworska, J., Worth, A. P., Cronin, M. T., McDowell, R. M., & Gramatica, P. (2003). Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. *Environmental Health Perspectives*, 111(10), 1361-1375.

– Ermiş, E., Aydın, A., Ünver, H., Sezen, S., & Mutlu, M. B. (2020). Microwave assisted synthesis, experimental and theoretical characterization and antibacterial activity screening of novel azomethine compounds containing thiophene and aminophenol functionality. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 243, 118761. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118761>

– Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin copigmentation—evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715-723.

– Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68, 2986-3008.

- Espinosa, R., Guzman, I., Martinez, K., Pabello, P., Chazaro, E., Rodriguez, G., Moreno, J., Fernandez, J., & Lopez, A. G. (2016). Do adipokines and inflammatory cytokines play a role in early knee osteoarthritis in a Latinoamerican population? *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(Suppl. 1), S191. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.01.375>
- Estévez, L., & Mosquera, R. A. (2007). A density functional theory study on pelargonidin. *The Journal of Physical Chemistry A*, 111(43), 11100-11109. <https://doi.org/10.1021/jp074941a>
- Estévez, L., & Mosquera, R. A. (2008). Molecular structure and antioxidant properties of delphinidin. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112(42), 10614-10623. <https://doi.org/10.1021/jp8043237>
- Estévez, L., & Mosquera, R. A. (2009). Conformational and substitution effects on the electron distribution in a series of anthocyanidins. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113(36), 9908-9919. <https://doi.org/10.1021/jp904298z>
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2013). Scientific Opinion on the reevaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA Journal*, 11(4), 3145-3196. Recuperado de http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3145.pdf
- Evteev, V. A., Shcherbak, N. P., & Kobliakov, V. A. (2006). A comparative study of induction regulation in cytochromes family 1 P450 in cell cultures at different stages of tumor transformation. *Tsitologiya*, 48, 717-722. PMID:17089626
- Fallah, A. A., Sarmast, E., & Jafari, T. (2020). Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of oxidative stress and antioxidative capacity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Functional Foods*, 68, 103912.
- Fang, J. (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews*, 46(4), 508-520.
- Fang, J. (2015). Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*, 31(11-12), 1301-1306.
- Farid, R., Rezaieyazdi, Z., Mirfeizi, Z., Hatef, M. R., Mirheidari, M., Mansouri, H., Esmaili, H., Bentley, G., Lu, Y., Foo, Y., et al. (2010). Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. *Nutrition Research*, 30(9), 601-606. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.08.010>
- Farr, J. E., & Giusti, M. M. (2018). Investigating the interaction of ascorbic acid with anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Molecules*, 23(4), 744.
- Fei, P., Zeng, F., Zheng, S., Chen, Q., Hu, Y., & Cai, J. (2020). Acylation of blueberry anthocyanins with maleic acid: Improvement of the stability and its application potential in intelligent color indicator packing materials. *Dyes and Pigments*, 184, 108852.
- Felgines, S., Talavéra, M.-P., Gonthier, M.-P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J.-L., & Rémésy, C. (2003). Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugated in humans. *Journal of Nutrition*, 133, 1296-1301.
- Felgines, C., Talavéra, S., Texier, O., Besson, C., Fogliano, V., Lamaison, J. L., la Fauci, L., Galvano, G., Rémésy, C., & Galvano, F. (2006). Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. *British Journal of Nutrition*, 95, 898-904.
- Felgines, O., Texier, C., Besson, C., Lyan, B., Lamaison, J.-L., & Scalbert, A. (2007). Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats. *British Journal of Nutrition*, 98, 1126-1131.

- Feng, R., Ni, H. M., Wang, S. Y., Tourkova, I. L., Shurin, M. R., Harada, H., & Yin, X. M. (2007). Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *282*, 13468-13476.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, *7*, 54-66.
- Fernandes, A., Brás, N. F., Mateus, N., & de Freitas, V. (2015). A study of anthocyanin self-association by NMR spectroscopy. *New Journal of Chemistry*, *39*(4), 2602-2611.
- Ferreira, A. A., Amaral, F. A., Duarte, I. D., Oliveira, P. M., Alves, R. B., Silveira, D., Azevedo, A. O., Raslan, D. S., & Castro, M. S. (2006a). Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *105*(1-2), 148-153.
- Ferreira, A. A., Oliveira, P. M., Evangelista, E. A., Alves, R. B., Pizziollo, V. R., Brasileiro, B. G., Rodrigues, F. M. O., Silveira, D., & Raslan, D. S. (2006b). Biological activities of aerial parts of *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *8*(3), 14-18.
- Ferreira, A. A., Ferraz, V., Oliveira, P. M., Godinho, A., Silveira, D., & Raslan, D. S. (2008). Microwave-assisted derivatization and GC-MS analyses of amino acids from *Ipomoea cairica* aqueous extract. *Chemistry of Natural Compounds*, *44*(5), 679-681.
- Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., & Brouillard, R. (1999). New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochemistry*, *51*(2), 125-132.
- Fioravanti, A., Karagülle, M., Bender, T., & Karagülle, M. Z. (2017). Balneotherapy in osteoarthritis: facts, fiction and gaps in knowledge. *European Journal of Integrative Medicine*, *9*, 148-150. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.01.001>
- Fioressi, S. E., Bacelo, D. E., Rojas, C., Aranda, J. F., & Duchowicz, P. R. (2019). Conformation-independent Quantitative Structure-Property Relationships study on water solubility of pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *171*, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.056>
- Flamini, R., Mattivi, F., De Rosso, M., Arapitsas, P., & Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(9), 19651-19669.
- Fleming, I. (1976). *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*. John Wiley.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, *45*(1), 7-18.
- Forman, H. J., Davies, K. J., & Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, *66*, 24-35.
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, Ø. M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, *63*(4), 435-440.
- Foster, R. (1969). *Organic charge-transfer complexes*. London: Academic Press.
- Foresman, J.B. & Frisch, A.E. (2015). *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. 3rd ed., Gaussian, Inc.: Wallingford, CT. ISBN: 978-1-935522-03-4
- Forester, S. C., & Waterhouse, A. L. (2008). Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9299-9304.

- Foti, M. C., Barclay, L. R. C., & Ingold, K. U. (2002). The role of hydrogen bonding on the H-atom-donating abilities of catechols and naphthalene diols and on a previously overlooked aspect of their infrared spectra. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(43), 12881-12888.
- Foti, M. C., Daquino, C., Mackie, I. D., DiLabio, G. A., & 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. *Journal of Organic Chemistry*, *73*(23), 9270-9282.
- Franke, R., & Gruska, A. (2003). General Introduction to QSAR. En R. Benigni (Ed.), *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Models of Mutagens and Carcinogens* (pp. 1-40). CRC Press.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., et al. (2009). *Gaussian 09*. Recuperado de <https://gaussian.com/>
- Fujiwara, Y., Kono, M., Ito, A., & Ito, M. (2018). Anthocyanins in perilla plants and dried leaves. *Phytochemistry*, *147*, 158-166.
- Fukui, Y., & Tanaka, Y. (2012). Novel compound contained in blue rose. Suntory Holdings, Patents: EP2412715-A1 and US20120011771-A1.
- Furtado, P., Figueiredo, P., Neves, H. C., & Pina, F. (1993). Photochemical and thermal degradation of anthocyanins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *75*(1-2), 113-118.
- Gabriele, M., Gerardi, C., Lucejko, J. J., Longo, V., Pucci, L., & Domenici, V. (2018). Effects of low sulfur dioxide concentrations on bioactive compounds and antioxidant properties of Aglianico red wine. *Food Chemistry*, *245*, 1105-1112.
- Galetto, L., & Bernardello, G. (2004). Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six Ipomoea species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*, *94*(2), 269-280.
- Galvano, L., La Fauci, G., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N. C., Tavazzi, B., & Galvano, G. (2004). Cyanidins: Metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *15*, 2-11.
- Galvano, L., Fauci, L., Vitaglione, P., Fogliano, V., Vanella, L., & Felgines, C. (2007). Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, *43*, 382-393.
- Gangadharan, R. P., & Krishnan, S. S. (2014). Natural bond orbital (NBO) population analysis of 1-azanaphthalene-8-ol. *Acta Physica Polonica A*, *125*, 18-22. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.125.18>
- Garcia, J., Duchowicz, P. R., & Castro, E. A. (2016). Considering the molecular conformational flexibility in QSAR studies. En A. G. Mercader, P. R. Duchowicz, & P. M. Sivakumar (Eds.), *Chemometrics Applications and Research: QSAR in Medicinal Chemistry* (pp. 129-158). CRC Press.
- García-Viguera, P., & Bridle, P. (1999). Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry*, *64*(1), 21-26.
- Garcia-Benitez, E., Cabello, F., & Revilla, E. (2003). Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(19), 5622-5629.

- Gardeli, C., Varela, K., Krokida, E., & Mallouchos, A. (2019). Investigation of anthocyanins stability from pomegranate juice (*Punica granatum* L. cv. Ermioni) under a simulated digestion process. *Medicines*, 6(3), 90. <https://doi.org/10.3390/medicines6030090>
- Gasiorowski, K., Szyba, K., Brokos, B., Kołaczyńska, B., Jankowiak-Włodarczyk, M., & Oszmiański, J. (1997). Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Letters*, 119(1), 37-46. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00248-6)
- Gasteiger, J., & Engel, T. (2006). *Chemoinformatics: A Textbook*. Wiley-VCH.
- Ge, S., Duo, L., Wang, J., GegenZhula, Yang, J., Li, Z., & Tu, Y. (2021). A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, 113877. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113877>
- Gebhardt, B., Sperl, R., Carle, R., & Müller-Maatsch, J. (2020). Assessing the sustainability of natural and artificial food colorants. *Journal of Cleaner Production*, 260, 120884.
- Geera, B., Ojwang, L. O., & Awika, J. M. (2012). New highly stable dimeric 3-deoxyanthocyanidin pigments from sorghum bicolor leaf sheath. *Journal of Food Science*, 77(11), C566-572.
- George, F., Figueiredo, P., Toki, K., Tatsuzawa, F., Saito, N., & Brouillard, R. (2001). Influence of trans-cis isomerisation of coumaric acid substituents on colour variance and stabilization in anthocyanins. *Phytochemistry*, 57(6), 791-795.
- Ghani, U. (2015). Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 133-162.
- Ghoochani, N., Karandish, M., Mowla, K., Haghhighizadeh, M. H., & Jalali, M. T. (2016). The effect of pomegranate juice on clinical signs, matrix metalloproteinases and antioxidant status in patients with knee osteoarthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4377-4381. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7647>
- Gillam, E. M. J., & Hunter, D. J. B. (2007). Chemical defense and exploitation: Biotransformation of xenobiotics by Cytochrome P450 enzymes. En *Metal Ions in Life Sciences: Vol. 3. The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins*. Wiley and Sons.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217-225.
- Glendening, E. D., Badenhop, J. K., Reed, A. E., Carpenter, J. E., Bohmann, J. A., Morales, C. M., Karafiloglou, P., Landis, C. R., & Weinhold, F. (2018). *NBO 7.0*. Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison.
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386, 376-387. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60802-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3)
- Goda, Y., Shimizu, T., Kato, Y., Nakamura, M., Maitani, T., Yamada, T., Terahara, N., & Yamaguchi, M. (1997). Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry*, 44(1), 183-186.
- Goh, S.-L., Persson, M. S. M., Stocks, J., Hou, Y., Lin, J., Hall, M. C., Doherty, M., & Zhang, W. (2019). Efficacy and potential determinants of exercise therapy in knee and hip osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 62(5), 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.04.006>

- Goiffon, J. P., Mouly, P. P., & Gaydou, E. M. (1999). Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 382(1-2), 39-50.
- Golbraikh, A., & Tropsha, A. (2002). Beware of q²! *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 20(4), 269-276. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(01\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(01)00123-1)
- Golbraikh, A., Wang, X. S., Zhu, H., & Tropsha, A. (2017). Predictive QSAR modeling: Methods and applications in drug discovery and chemical risk assessment. En J. Leszczynski, A. Kaczmarek-Kedziera, T. Puzyn, M. G. Papadopoulos, H. Reis, & M. K. Shukla (Eds.), *Handbook of Computational Chemistry* (pp. 2303-2340). Springer.
- Goldring, M. B., & Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 23(5), 471-478. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328349c2b1>
- Gomez-Cabrera, M. C., Ristow, M., & Viña, J. (2012). Antioxidant supplements in exercise: Worse than useless? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302(4), E476-E477.
- Gonçalves, A. C., Nunes, A. R., Falcão, A., Alves, G., & Silva, L. R. (2021). Dietary effects of anthocyanins in human health: A comprehensive review. *Pharmaceuticals*, 14(7), 690.
- Gonçalves, A. C., Falcão, A., Alves, G., Silva, L. R., & Flores-Félix, J. D. (2024). Antioxidant activity of the main phenolics found in red fruits: An in vitro and in silico study. *Food Chemistry*, 452, 139459.
- González-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3933–3939.
- Goodarzi, S., Tabatabaei, M. J., Mohammad Jafari, R., et al. (2020). Cuminum cyminum fruits as source of luteolin-7-O-glucoside, potent cytotoxic flavonoid against breast cancer cell lines. *Natural Product Research*, 34(11), 1602-1606. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1519824>
- Goto, T., & Kondo, T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition*, 30, 17-33. <https://doi.org/10.1002/anie.199100171>
- Gould, K. S., McKelvie, J., & Markham, K. R. (2002). Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell & Environment*, 25, 1261–1269.
- Goyal, M., Grover, S., Dhanjal, J. K., Goyal, S., Tyagi, C., & Grover, A. (2014). Molecular modelling studies on flavonoid derivatives as dual site inhibitors of human acetyl cholinesterase using 3D-QSAR, pharmacophore and high throughput screening approaches. *Medicinal Chemistry Research*, 23(5), 2122-2132.
- Gramatica, P. (2007). Principles of QSAR models validation: Internal and external. *QSAR & Combinatorial Science*, 26(5), 694-701.
- Grässel, S., & Aszodi, A. (2019). Osteoarthritis and cartilage regeneration: Focus on pathophysiology and molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6156. <https://doi.org/10.3390/ijms20246156>
- Grigalius, I., & Petrikaite, V. (2017). Relationship between antioxidant and anticancer activity of trihydroxyflavones. *Molecules*, 22(12), 2269. <https://doi.org/10.3390/molecules22122169>

- Groh, I. A. M., Bakuradze, T., Pahlke, G., Richling, E., & Marko, D. (2020). Consumption of anthocyanin-rich beverages affects Nrf2 and Nrf2-dependent gene transcription in peripheral lymphocytes and DNA integrity of healthy volunteers. *BMC Chemistry*, *14*(1), 39.
- Gross, K. C., & Seybold, P. G. (2001). Substituent effects on the physical structure and pKa of phenol. *International Journal of Quantum Chemistry*, *85*(6), 569-579. <https://doi.org/10.1002/qua.1525>
- Grzesik, M., Bartosz, G., Stefaniuk, I., Pichla, M., Namieśnik, J., & Sadowska-Bartosz, I. (2019). Dietary antioxidants as a source of hydrogen peroxide. *Food Chemistry*, *278*, 692-699.
- Guha, R., & Willighagen, E. (2012). A survey of quantitative descriptions of molecular structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *12*(18), 1946-1956.
- Gui, H., Sun, L., Liu, R., Si, X., Li, D., Wang, Y., Shu, C., Sun, X., Jiang, Q., Qiao, Y., et al. (2023). Current knowledge of anthocyanin metabolism in the digestive tract: Absorption, distribution, degradation, and interconversion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(4), 5953-5966.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, *94*(3), 651-715.
- Gunda, S. K., Narasimha, S. K. M., & Shaik, M. (2014). P56lck kinase inhibitor studies: A 3D QSAR approach towards designing new drugs from flavonoid derivatives. *International Journal of Computational Biology and Drug Design*, *7*(3), 278-294.
- Gunda, S. K., Pasula, S., Gurram, V., & Shaik, M. (2015a). 3D QSAR and in silico docking studies of natural flavonoid derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *30*(1), 61-68.
- Gunda, S. K., Kongaleti, S. F., & Shaik, M. (2015b). Natural flavonoid derivatives as oral human epidermoid carcinoma cell inhibitors. *International Journal of Computational Biology and Drug Design*, *8*(1), 19-39.
- Guo, X., Tresserra-Rimbau, A., Estruch, R., Martínez-González, M. A., Medina-Remón, A., Fitó, M., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Portillo, M. P., Moreno, J. J., et al. (2017). Polyphenol levels are inversely correlated with body weight and obesity in an elderly population after 5 years of follow up (the randomized PREDIMED study). *Nutrients*, *9*(5), 452. <https://doi.org/10.3390/nu9050452>
- Guzmán, R., Santiago, C., & Sánchez, M. (2009). A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins. *Journal of Molecular Structure*, *935*(1-3), 110-114.
- Guzmán, R., Santiago, C., & Sánchez, M. (2009). A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins. *Journal of Molecular Structure*, *935*, 110-114.
- Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Abu Bakar, F., Jalilian, F. A., Jahanshiri, F., Abas, F., & Sekawi, Z. (2013). Novel anticancer activity and anticancer mechanisms of *Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra. *European Journal of Integrative Medicine*, *5*, 450-464.
- Hale, K. L., McGrath, S. P., Lombi, E., Stack, S. M., Terry, N., Pickering, I. J., et al. (2001). Molybdenum sequestration in *Brassica* species: A role for anthocyanins? *Plant Physiology*, *126*, 1391-1402.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, *70*(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5ta ed.). Oxford University Press.

- Hameed, A., Galli, M., Adamska-Patruno, E., Krętownski, A., & Ciborowski, M. (2020). Select polyphenol-rich berry consumption to defer or deter diabetes and diabetes-related complications. *Nutrients*, 12(9), 2538. <https://doi.org/10.3390/nu12092538>
- Hamzeh-Mivehroud, M., Rahmani, S., Feizi, M. A., Dastmalchi, S., & Rashidi, M. R. (2014). In vitro and in silico studies to explore structural features of flavonoids for aldehyde oxidase inhibition. *Archiv der Pharmazie*, 347(10), 738-747.
- Hamzeh-Mivehroud, M., Sokouti, B., & Dastmalchi, S. (2015). An introduction to the basic concepts in QSAR-aided drug design. En K. Roy (Ed.), *Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design, Predictive Toxicology, and Risk Assessment* (pp. 1-20). IGI Global.
- Hansch, C., Maloney, P. P., Fujita, T., & Muir, R. M. (1962). Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature*, 194(4824), 178-180.
- Hansch, C., Leo, A., & Hoekman, D. (1995). *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. American Chemical Society.
- Harada, K., Kano, M., Takayanagi, T., Yamakawa, O., & Ishikawa, F. (2004). Absorption of acylated anthocyanins in rats and humans after ingesting an extract of Ipomoea batatas purple sweet potato tuber. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(7), 1500-1507.
- Harborne, J. B. (1966). Comparative biochemistry of flavonoids-II: 3-desoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads. *Phytochemistry*, 5(3), 589-600.
- Harborne, J. B. (1967). *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press.
- Harborne, J. B. (1988). *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (1998). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 15(6), 631-652.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd ed.). Chapman and Hall.
- Harborne, J. B., & Baxter, H. (Eds.). (1999). Anthocyanins. En J. B. Harborne & H. Baxter (Eds.), *The Handbook of Natural Flavonoids* (Vol. 2, pp. 1-114). John Wiley & Sons.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 18(3), 310-333.
- Haseeb, A., Chen, D., & Haqqi, T. M. (2013). Delphinidin inhibits IL-1 β -induced activation of NF- κ B by modulating the phosphorylation of IRAK-1 (Ser376) in human articular chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*, 52(6), 998-1008. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes363>
- He, J., Magnuson, B. A., Lala, G., Tian, Q., Schwartz, S. J., & Giusti, M. M. (2006). Intact anthocyanins and metabolites in rat urine and plasma after 3 months of anthocyanin supplementation. *Nutrition and Cancer*, 54(1), 3-12.
- He, J. (2008). *Isolation of Anthocyanin Mixtures from Fruits and Vegetables and Evaluation of Their Stability, Availability and Biotransformation in the Gastrointestinal Tract* (Doctoral dissertation). The Ohio State University, Columbus, Ohio, EE.UU.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 163-187.

- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines. II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, *17*(2), 1483-1519.
- He, X., Li, X., Lv, Y., & He, Q. (2015). Composition and color stability of anthocyanin-based extract from purple sweet potato. *Food Science and Technology (Campinas)*, *35*(3), 468-473. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/cta/v35n3/0101-2061-cta-1678-457X6687.pdf>
- He, X., Luan, F., Yang, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Fang, J., Wang, M., Zuo, M., & Li, Y. (2020). *Passiflora edulis*: An insight into current researches on phytochemistry and pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 617. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572-584.
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 4107-4112.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(9), 3590-3595.
- Hellström, J., Mattila, P., & Karjalainen, R. (2013). Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*, *31*, 12-19.
- Hemingway, R. W., & Laks, P. E. (Eds.). (2012). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance* (Vol. 59, Basic Life Sciences). Springer Science & Business Media. (Original work published 1992).
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chemistry*, *63*(4), 491-498.
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., & Lauvergeat, V. (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2465-2483.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, *121*(3), 691-696.
- Hillebrand, S., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2004). Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(24), 7331-7338.
- Hocine, R., Farid, D., Yasmine, S., Khodir, M., Kapranov, V. N., & Kiselev, E. F. (2018). Recent advances on stability of anthocyanins. *Vestnik RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, *13*(3), 257-286.
- Holton, T. A., & Cornish, E. C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, *7*, 1071-1083.
- Hong, H., Xie, Q., Ge, W., Qian, F., Fang, H., Shi, L., & Tong, W. (2008). Mold2, molecular descriptors from 2D structures for chemoinformatics and toxicoinformatics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *48*(7), 1337-1344. <https://doi.org/10.1021/ci800038f>

- Hongmao, S. (2015). *A Practical Guide to Rational Drug Design*. Elsevier/Woodhead Publishing.
- Hossain, M. R., Kim, H. T., Shanmugam, A., Nath, U. K., Goswami, G., Song, J. Y., Park, J.-I., & Nou, I. S. (2018). Expression profiling of regulatory and biosynthetic genes in contrastingly anthocyanin rich strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars reveals key genetic determinants of fruit color. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 656.
- Hou, D. X., Yanagita, T., Uto, T., et al. (2005). Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochemical Pharmacology*, 70(3), 417-425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.05.003>
- Houghton, A., Appelhagen, I., & Martin, C. (2021). Natural blues: Structure meets function in anthocyanins. *Plants*, 10(4), 726.
- Hu, J., Li, X., Wu, N., Zhu, C., Jiang, X., Yuan, K., Li, Y., Sun, J., & Bai, W. (2023). Anthocyanins prevent AAPH-induced steroidogenesis disorder in Leydig cells by counteracting oxidative stress and StAR abnormal expression in a structure-dependent manner. *Antioxidants*, 12(3), 508.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, Y., Rong, C., Zhang, R., & Liu, S. (2017). Evaluating frontier orbital energy and HOMO/LUMO gap with descriptors from density functional reactivity theory. *Journal of Molecular Modeling*, 23, 3. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3175-x>
- Hytönen, T., Graham, J., & Harrison, R. (Eds.). (2018). *The genomes of Rosaceous berries and their wild relatives*. Springer Cham.
- Ichianagi, T., Hatano, Y., Matsugo, S., & Konishi, T. (2004). Simultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in bilberry towards reactive nitrogen species. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52(11), 1312-1315.
- Ichianagi, T., Terahara, N., Rahman, M. M., & Konishi, T. (2006). Gastrointestinal uptake of nasunin, acylated anthocyanin in eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5306-5312.
- Idaka, E. (1991). Acylated anthocyanin and process for producing the same as well as pigment composition containing the same. US Patent No. US4999423. Suntory Limited.
- Ignacio, R. M. C., Kim, C.-S., & Kim, S.-K. (2014). Immunological profiling of obesity. *Journal of Lifestyle Medicine*, 4(1), 1-7. <https://doi.org/10.15280/jlm.2014.4.1.1>
- International Food Information Council (IFIC) and Foundation US Food and Drug Administration (FDA). (2004). *Food ingredients and colors*. IFIC Foundation.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS, INCHEM), World Health Organization (WHO). (1982a). Toxicological Evaluation of Certain Drug Residues in Food, Toxicological Evaluation of Certain Food Additives, 521. Introduction. Twenty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO Food Additives Series 17. Recuperado de <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je01.htm>
- International Programme on Chemical Safety (IPCS, INCHEM). (1982b). Anthocyanins. WHO Food Additives Series 17. Recuperado de <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je05.htm>

- ISIDA/Fragmentor. (2017). Laboratoire de Chémoinformatique, Chimie de la Matière Complexe (SMS UMR 7140). Université de Strasbourg. Recuperado de <http://complex-matter.unistra.fr/equipes-de-recherche/laboratoire-de-chemoinformatique/home>
- Islam, M. S., Yoshimoto, M., Terahara, N., & Yamakawa, O. (2002). Anthocyanin compositions in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(11), 2483-2486.
- Ito, N., Tanaka, A., Katsuki, T., & Fujii, T. (2002). Why do flavylium salts show so various colors in solution?: Effect of concentration and water on the flavylium's color changes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 150(1-3), 153-157.
- Iwashina, T. (2015). Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: A review. *Natural Product Communications*, 10(3), 529-544.
- Jaganath, I. B., & Crozier, A. (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. In C. G. Fraga (Ed.), *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology* (pp. 1-40). John Wiley & Sons.
- Jaldappagari, S., Motohashi, N., Gangeenahalli, M. P., & Naismith, J. H. (2008). Bioactive mechanism of interaction between anthocyanins and macromolecules like DNA and proteins. En N. Motohashi (Ed.), *Bioactive Heterocycles VI: Flavonoids and Anthocyanins in Plants, and Latest Bioactive Heterocycles I* (pp. 49-65). Springer.
- Jan, R., Asif, S., Asaf, S., Lubna, Khan, Z., & Kim, K. M. (2024). Unveiling the protective role of anthocyanin in rice: Insights into drought-induced oxidative stress and metabolic regulation. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1397817.
- Jamei, R., & Babaloo, F. (2017). Stability of blueberry (*Cornus mas*—Yulyush) anthocyanin pigment under pH and co-pigment treatments. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2128-2133.
- Janeiro, P., & Brett, A. M. O. (2007). Redox behavior of anthocyanins present in *Vitis vinifera* L. *Electroanalysis*, 19(17), 1779-1786.
- Jeong, J. W., Lee, H. H., Lee, K. W., Kim, K. Y., Kim, S. G., Hong, S. H., Kim, G. Y., Park, C., Kim, H. K., Choi, Y. W., et al. (2016). Mori folium inhibits interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of NF- κ B and p38 MAPK in SW1353 human chondrocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(2), 452-460. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2443>
- Jiang, X., Tang, X., Zhang, P., Liu, G., & Guo, H. (2014). Cyanidin-3-O- β -glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway. *Biochemical Pharmacology*, 90, 135-144.
- Jiang, C., Sun, Z.-M., Hu, J.-N., Jin, Y., Guo, Q., Xu, J.-J., Chen, Z.-X., Jiang, R.-H., & Wu, Y.-S. (2019). Cyanidin ameliorates the progression of osteoarthritis via the Sirt6/NF- κ B axis in vitro and in vivo. *Food & Function*, 10(9), 5873-5885. <https://doi.org/10.1039/c9fo00742c>
- Jiang, Y., Li, X., Zhang, Y., Wu, B., Li, Y., Tian, L., Sun, J., & Bai, W. (2024). Mechanism of action of anthocyanin on the detoxification of foodborne contaminants-A review of recent literature. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23, e13259.
- Jiménez-Gallardo, L., López-Arrabé, J., Pérez-Tris, J., & Remacha, C. (2024). Young male blackcaps with blood parasite coinfections cope with oxidative stress favouring anthocyanin-rich food during migratory fattening. *Journal of Avian Biology*, e03214.

- Jin, H. L., Lim, J. D., & Choung, M. G. (2013). Studies on the anthocyanin profile and biological properties from the fruits of *Acanthopanax senticosus* (Siberian ginseng). *Journal of Functional Foods*, *5*, 380-388.
- Jing, P., & Giusti, M. M. (2013). Analysis of anthocyanins in biological samples. In T. C. Wallace & M. M. Giusti (Eds.), *Anthocyanins in Health and Disease* (Chapter 4, pp. 115-140). CRC Press.
- Jing, P., Zhao, S., Ruan, S., Sui, Z., Chen, L., Jiang, L., & Qian, B. (2014). Quantitative studies on structure–ORAC relationships of anthocyanins from eggplant and radish using 3D-QSAR. *Food Chemistry*, *145*, 365-371.
- Johnson, A. M., & Maggiora, G. M. (1990). *Concepts and Applications of Molecular Similarity*. John Wiley & Sons.
- Johnson, E. T., Berhow, M. A., & Dowd, P. F. (2008). Colored and white sectors from star-patterned petunia flowers display differential resistance to corn earworm and cabbage looper larvae. *Journal of Chemical Ecology*, *34*, 757-765.
- Joshi, Y., & Goyal, B. (2011). Anthocyanins: A lead for anticancer drugs. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, *1*, 1119-1126.
- Jung, H., Shin, S. Y., Jung, Y., Tran, T. A., Lee, H. O., Jung, K. Y., Koh, D., Cho, S. K., & Lim, Y. (2015). Quantitative relationships between the cytotoxicity of flavonoids on the human breast cancer stem-like cells MCF7-SC and their structural properties. *Chemical Biology & Drug Design*, *86*(4), 496-508.
- Jung, S., Lee, M. S., Choi, A. J., Kim, C. T., & Kim, Y. (2019). Anti-inflammatory effects of high hydrostatic pressure extract of mulberry (*Morus alba*) fruit on LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Molecules*, *24*(7), 1425. <https://doi.org/10.3390/molecules24071425>
- Jurd, L. (1963). Anthocyanins and related compounds. I. Structural transformations of flavylium salts in acidic solutions. *Journal of Organic Chemistry*, *28*, 987-991. <https://doi.org/10.1021/jo01039a027>
- Kähkönen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(3), 628-633.
- Kaliszan, R. (2007). QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships. *Chemical Reviews*, *107*(7), 3212-3246.
- Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., & others. (1995). Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation*, *13*(6), 590-594.
- Kammerer, D. R. (2016). Anthocyanins. En *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 61-80). Elsevier.
- Kampa, M., Nifli, A. P., Notas, G., & Castanas, E. (2007). Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *159*, 79-113.
- Kang, H. J., Ko, M. J., & Chung, M. S. (2021). Anthocyanin structure and pH dependent extraction characteristics from blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in subcritical water state. *Foods*, *10*(3), 527.
- Karawya, M. S., Ammar, N. M., Hifnawy, M. S., Al-Okbi, S. Y., Mohamed, D. A., & El-Anssary, A. A. (2010). Phytochemical study and evaluation of the antiinflammatory activity of some medicinal plants growing in Egypt. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, *18*(4), 139-150.
- Kardum, N., Petrović-Oggiano, G., Takic, M., Glibetić, N., Zec, M., Debeljak-Martacic, J., & Konić-Ristić, A. (2014). Effects of glucomannan-enriched, Aronia juice-based supplement on cellular

antioxidant enzymes and membrane lipid status in subjects with abdominal obesity. *Scientific World Journal*, 2014, 869250. <https://doi.org/10.1155/2014/869250>

- Karrer, P., & de Meuron, G. (1932) Pflanzenfarbstoffe XLV. Zur Konstitution der diglucosidischen Anthocyane. *Helv. Chim. Acta*, 15, 1212-1217.
- Kaur, S., Tiwari, V., Kumari, A., Chaudhary, E., Sharma, A., Ali, U., & Garg, M. (2023). Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology*, 361, 12-29.
- Kayodé, A. P., Nout, M. J., Linnemann, A. R., Hounhouigan, J. D., Berghofer, E., & Siebenhandl-Ehn, S. (2011). Uncommonly high levels of 3-deoxyanthocyanidins and antioxidant capacity in the leaf sheaths of dye sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 1178-1184.
- Kennedy, J. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 866(1), 25-34.
- Khan, A. U., & Wilson, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology*, 2(7), 437-445.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779.
- Kimble, R., Jones, K., & Howatson, G. (2023). The effect of dietary anthocyanins on biochemical, physiological, and subjective exercise recovery: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(7), 1262-1276.
- Kirton, S. B., Baxter, C. A., & Sutcliffe, M. J. (2002). Comparative modelling of cytochromes P450. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(3), 385-406. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00010-8)
- Koca, B., & Karadeniz, B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 121(4), 447-450.
- Kojima, S., Thukimoto, M., Cuttler, J. M., Inoguchi, K., Ootaki, T., Shimura, N., Koga, H., & Murata, A. (2018). Recovery from rheumatoid arthritis following 15 months of therapy with low doses of ionizing radiation: A case report. *Dose-Response*, 16(3), 1559325818784719. <https://doi.org/10.1177/1559325818784719>
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins—More than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 239-240.
- Kondo, T., Kawai, T., Tamura, H., & Goto, T. (1987). Structure determination of heavenly blue anthocyanin, a complex monomeric anthocyanin from the morning glory *Ipomoea tricolor*, by means of the negative NOE method. *Tetrahedron Letters*, 28(20), 2273-2276.
- Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., et al. (1992). Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature*, 358(515), 515-518. <https://doi.org/10.1038/358515a0>
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Kostka, T., Ostberg-Potthoff, J. J., Briviba, K., Matsugo, S., Winterhalter, P., & Esatbeyoglu, T. (2020). Pomegranate (*Punica granatum* L.) extract and its anthocyanin and copigment fractions-free radical scavenging activity and influence on cellular oxidative stress. *Foods*, 9(11), 1617.

- Kozłowska, A., & Dzierżanowski, T. (2021). Targeting inflammation by anthocyanins as the novel therapeutic potential for chronic diseases: An update. *Molecules*, 26(14), 4380. <https://doi.org/10.3390/molecules26144380>
- Krishna, V., Singh, S., Kaur, C., Dahuja, A., & Praveen, S. (2017). Anthocyanin - a premium functional superfood supplement. Division of Biochemistry, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110012. Disponible en: https://www.iari.res.in/files/Bulletins/Anthocyanin_31012020.pdf.
- Kubow, S., Iskandar, M. M., Sabally, K., Azadi, B., Sadeghi Ekbatan, S., Kumarathasan, P., Das, D. D., Prakash, S., Burgos, G., & Zum Felde, T. (2016). Biotransformation of anthocyanins from two purple-fleshed sweet potato accessions in a dynamic gastrointestinal system. *Food Chemistry*, 192, 171-177.
- Kubinyi, H. (1988). Free Wilson Analysis. Theory, applications and its relationship to Hansch analysis. *Molecular Informatics*, 7(3), 121-133.
- Kuehl, K. S., Elliot, D. L., Sleigh, A. E., & Smith, J. L. (2012). Efficacy of tart cherry juice to reduce inflammation biomarkers among women with inflammatory osteoarthritis (OA). *Journal of Food Studies*, 1(1), 14-25. <https://doi.org/10.5296/jfs.v1i1.1927>
- Kumpulainen, J. T., & Salonen, J. T. (1998). In *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease* (pp. 41-54). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Kurilich, A. C., Clevidence, B. A., Britz, S. J., Simon, P. W., & Novotny, J. A. (2005). Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6537-6542.
- Laleh, G. H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2005). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(2), 90-92.
- Lallianrawna, S., Lalrotluanga, Muthukumaran, R. B., Gurusubramanian, G., & Senthilkumar, N. (2014). Larvicidal activity of Ipomoea cairica (L.) Sweet and Ageratina adenophora (Spreng.) King & H. Rob. plant extracts against arboviral and filarial vector, Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology*, 141, 112-121.
- Landi, M., Tattini, M., & Gould, K. S. (2015). Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119, 4-17.
- Langowski, J., & Long, A. (2002). Computer systems for the prediction of xenobiotic metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(3), 407-415. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00011-X)
- Lao, T. D., & Le, T. A. H. (2021). Data integration reveals the potential biomarkers of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Diagnostics (Basel)*, 11(3), 412. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030412>
- Lee, M. J., Park, J. S., Choi, D. S., & Jung, M. Y. (2013). Characterization and quantitation of anthocyanins in purple-fleshed sweet potatoes cultivated in Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(12), 3148-3158.
- Lee, M., Sorn, S. R., Park, Y., & Park, H. K. (2016). Anthocyanin rich-black soybean testa improved visceral fat and plasma lipid profiles in overweight/obese Korean adults: A randomized controlled trial. *Journal of Medicinal Food*, 19(11), 995-1003. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3762>

- Lee, H.-H., Lee, S.-G., Shin, J.-S., Lee, H.-Y., Yoon, K., Ji, Y. W., Jang, D. S., & Lee, K.-T. (2017). p-Coumaroyl anthocyanin mixture isolated from tuber epidermis of *Solanum tuberosum* attenuates reactive oxygen species and pro-inflammatory mediators by suppressing NF- κ B and STAT1/3 signaling in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(11), 1894-1902. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00362>
- Lee, D. Y., Park, Y. J., Song, M. G., Kim, D. R., Zada, S., & Kim, D. H. (2020). Cytoprotective effects of delphinidin for human chondrocytes against oxidative stress through activation of autophagy. *Antioxidants*, 9(1), 83. <https://doi.org/10.3390/antiox9010083>
- Les, F., Cásedas, G., Gómez, C., Moliner, C., Valero, M. S., & López, V. (2021). The role of anthocyanins as antidiabetic agents: From molecular mechanisms to in vivo and human studies. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 77, 109-131. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00j>
- Lesaffre, E. (2018). Noninferiority clinical trials: The good, the bad, and the ugly. *Seminars in Liver Disease*, 38(2), 97-102. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1655777>
- Lev-Yadun, S., & Gould, K. S. (2007). What do red and yellow autumn leaves signal? *The Botanical Review*, 73(4), 279-289.
- Levy, R., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2019). The influence of chemical structure and the presence of ascorbic acid on anthocyanins stability and spectral properties in purified model systems. *Foods*, 8(7), 207.
- Lewis, D. F. V. (1999). Frontier orbitals in chemical and biological activity: Quantitative relationships and mechanistic implications. *Drug Metabolism Reviews*, 31(4), 755-816. <https://doi.org/10.1081/DMR-100101943>
- Li, Y. W., Wang, D., Li, X. G., & Jin, Y. (2014). Anthocyanins extracted from Chinese blueberry and its anticancer effects on HepG2 cells. *Advanced Materials Research*, 887-888, 553-557.
- Li, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Sun, R., & Xia, M. (2015). Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients. *The Journal of Nutrition*, 145(4), 742-748.
- Li, J. H., Pan, J. T., & Yin, Y. Q. (2016). Two novel resin glycosides isolated from *Ipomoea cairica* with α -glucosidase inhibitory activity. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(3), 227-231.
- Li, A., Yeo, K., Welty, D., & Rong, H. (2018). Development of guanfacine extended-release dosing strategies in children and adolescents with ADHD using a physiologically based pharmacokinetic model to predict drug-drug interactions with moderate CYP3 A4 inhibitors or inducers. *Paediatric Drugs*, 20(2), 181-194. <https://doi.org/10.1007/s40272-017-0270-0>
- Li, J., Wang, B., He, Y., Wen, L., Nan, H., Zheng, F., Liu, H., Lu, S., Wu, M., & Zhang, H. (2021a). A review of the interaction between anthocyanins and proteins. *Food Science and Technology International*, 27(5), 470-482.
- Li, P., Feng, D., Yang, D., Li, X., Sun, J., Wang, G., Tian, L., Jiang, X., & Bai, W. (2021b). Protective effects of anthocyanins on neurodegenerative diseases. *Trends in Food Science and Technology*, 117, 205-217.
- Liaw, A., & Svetnik, V. (2015). QSAR modeling: Prediction of biological activity from chemical structure. En A. L. Gould (Ed.), *Statistical Methods for Evaluating Safety in Medical Product Development* (pp. 66-83). Wiley.
- Lila, M. A. (2004). Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306-313.

- Lima, O. O. A., & Braz-Filho, R. (1997). Dibenzylbutyrolactone lignans and coumarins from *Ipomoea cairica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8(3), 235-238.
- Lin, B. W., Gong, C. C., Song, H. F., & Cui, Y. Y. (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1226-1243.
- Liu, J., Chen, L., Cai, S., & Wang, Q. (2012). Semisynthesis of apigenin and acacetin-7-O- β -D-glycosides from naringin and their cytotoxic activities. *Carbohydrate Research*, 357, 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.05.013>
- Liu, X., Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Chen, J. (2013). Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. *Food Chemistry*, 141(4), 3034-3041.
- Liu, J., Song, J., Huang, K., Michel, D., & Fang, J. (2018a). HPLC-MS/MS analysis of anthocyanins in human plasma and urine using protein precipitation and dilute-and-shoot sample preparation methods, respectively. *Biomedical Chromatography*. <https://doi.org/10.1002/bmc.4177>
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F. M., Visser, R. G. F., & Bovy, A. (2018b). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review. *Frontiers in Chemistry*, 6, 52.
- Liu, P., Li, W., Hu, Z., Qin, X., & Liu, G. (2020). Isolation, purification, identification, and stability of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *LWT*, 126, 109334.
- Lobayan, R. M., Jubert, A. H., Vitale, M. G., & Pomilio, A. B. (2009). Conformational and electronic (AIM/NBO) study of unsubstituted A-type dimeric proanthocyanidin. *Journal of Molecular Modeling*, 15(5), 537-550. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0389-6>
- Lobayan, R. M., Bentz, E. N., Jubert, A. H., & Pomilio, A. B. (2012). Structural and electronic properties of Z isomers of (4 α →6", 2 α →O→1")-phenylflavans substituted with R=H, OH and OCH₃ calculated in aqueous solution with PCM solvation model. *Journal of Molecular Modeling*, 18(4), 1667-1676. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1188-z>
- Lobayan, R. M., Bentz, E. N., Jubert, A. H., & Pomilio, A. B. (2013). Charge delocalization in Z-isomers of (4 α →6', 2 α →O→1')-phenylflavans with R=H, OH and OCH₃. Effects on bond dissociation enthalpies and ionization potentials. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1006, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2012.11.008>
- Lobayan, R. M., & Schmit, M. C. P. (2018). Conformational and NBO studies of serotonin as a radical scavenger. Changes induced by the OH group. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 80, 224-237. <https://doi.org/10.1016/j.jm gm.2018.01.006>
- Lobayan, R. M., Bentz, E. N., & Pomilio, A. B. (2020). *Estudio Cuántico Molecular de flavanos como antioxidantes potenciales. Estructuras, reactividad, distribución electrónica y efectos de deslocalización*. Editorial Académica Española.
- Long, L. H., Hoi, A., & Halliwell, B. (2010). Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(2), 162-169.
- Lopes da Silva, F., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 374-382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
- Lorzadeh, E., Heidary, Z., Mohammadi, M., Nadjarzadeh, A., Ramezani-Jolfaie, N., & Salehi-Abargouei, A. (2022). Does pomegranate consumption improve oxidative stress? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Clinical Nutrition ESPEN*, 47, 117-127.

- Lu, T. S., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1991). An acylated peonidin glycoside in the violet-blue flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, *30*(7), 2387-2390.
- Lu, T. S., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1992a). Acylated peonidin glycosides in the violet-blue cultivars of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, *31*(2), 659-663.
- Lu, T. S., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1992b). Acylated pelargonidin glycosides in the red-purple flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, *31*(1), 289-295.
- Lu, L., Qiang, M., Li, F., Zhang, H., & Zhang, S. (2014). Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: A DFT/B3LYP study. *Dyes and Pigments*, *103*, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.12.015>
- Lu, J.N., Panchanathan, R., Lee, W.S., Kim, H.J., Kim, D.H., Choi, Y.H., Kim, G.S., Shin, S.C., & Hong, S.C. (2017). Anthocyanins from the fruit of *Vitis coignetiae* Pulliat inhibit TNF-augmented cancer proliferation, migration, and invasion in A549 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *18*, 2919-2923.
- Lučić, B., Stepanić, V., Plavšić, D., Amić, A., & Amić, D. (2014). Correlation between ¹³C NMR chemical shifts and antiradical activity of flavonoids. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, *145*(4), 457-463.
- Lule, S. U., & Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International*, *21*(4), 367-388.
- Lúquez Bibiloni, C. V., & Aguilera Radic, J. M. (2006). El color en las aceitunas negras naturales de mesa. Nueva técnica de mensura digitalizada para optimizar el método de oscurecimiento natural. *Revista FCA UNCuyo*, *38*(1), 65-75. Accesible en: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/767/luquezAgrarias1-06.pdf
- Ma, S. C., Du, J., But, P. P. H., Deng, X. L., Zhang, Y. W., Ooi, V. E. C., Xu, H. X., Lee, S. H. S., & Lee, S. F. (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of Ethnopharmacology*, *79*(2), 205-211.
- Ma, R. J., Wang, N. L., Zhu, H., Guo, S. J., & Chen, D. S. (2009). Isolation and identification of allelochemicals from invasive plant *Ipomoea cairica*. *Allelopathy Journal*, *24*(1), 77-84.
- Macheix, J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics*. CRC Press. pp. 41-54.
- Maestro 9.1. (n.d.). Schrödinger LLC.
- Magnuson, B. A., Lala, G., Tian, Q., Schwartz, S. J., & Giusti, M. M. (2006). Intact anthocyanins and metabolites in rat urine and plasma after 3 months of anthocyanin supplementation. *Nutrition and Cancer*, *54*(1), 3-12.
- Mahesh, G., Anil Kumar, K., & Reddanna, P. (2021). Overview on the discovery and development of anti-inflammatory drugs: Should the focus be on synthesis or degradation of PGE2? *Journal of Inflammation Research*, *14*, 253-263. <https://doi.org/10.2147/JIR.S278514>
- Maier, A., Wiedemann, J., Rapp, F., Papenfuß, F., Rödel, F., Hehlhans, S., Gaipl, U. S., Kraft, G., Fournier, C., & Frey, B. (2021). Radon exposure — therapeutic effect and cancer risk. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 316. <https://doi.org/10.3390/ijms22010316>
- Maksić, Z. B. (1991). *Theoretical models of chemical bonding. Part 3: Molecular spectroscopy, electronic structure and intramolecular interactions*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-58179-3>

- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 170-176.
- Manivannan, E., & Moorthy, N. S. H. N. (2013). QSAR analysis and pharmacophore mapping of catecholic flavonoids for telomerase inhibitory activity. *Latin American Journal of Pharmacy*, 32(6), 802-808.
- Mao, J. J., Pillai, G. G., Andrade, C. J., et al. (2022). Integrative oncology: Addressing the global challenges of cancer prevention and treatment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(2), 144-164. <https://doi.org/10.3322/caac.21706>
- Marc, J.-F. (2018). Regenerative medicine in osteoarthritis: A new chance for knee osteoarthritis patients. *International Journal of Clinical Rheumatology*, 13(5), 278-279. <https://doi.org/10.4172/1758-4272.1000198>
- Marstrand, K., Warholm, L., Pedersen, F., & Winther, K. (2017). Dose dependent impact of rose-hip powder in patients suffering from osteoarthritis of the hip and/or knee – a double blind, randomized, placebo controlled, parallel group, phase III study. *International Journal of Complementary and Alternative Medicine*, 7(1), 00210. <https://doi.org/10.15406/ijcam.2017.07.00210>
- Marszałek, K., Woźniak, Ł., Kruszewski, B., & Skąpska, S. (2017). The effect of high pressure techniques on the stability of anthocyanins in fruit and vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 277.
- Martens, S., Knott, J., Seitz, C. A., Janvari, L., Yu, S. N., & Forkmann, G. (2003). Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 227-235.
- Martin, K. R., Burrell, L., & Bopp, J. (2018). Authentic tart cherry juice reduces markers of inflammation in overweight and obese subjects: A randomized, crossover pilot study. *Food & Function*, 9(10), 5290-5300. <https://doi.org/10.1039/c8fo01492b>
- Martínez-López, Y., Marrero-Ponce, Y., Barigye, S. J., Teran, E., Martínez-Santiago, O., Zambrano, C. H., & Torres, F. J. (2020). When global and local molecular descriptors are more than the sum of its parts: Simple, But Not Simpler? *Molecular Diversity*, 24(4), 913-932.
- Martins, I. C., Maciel, M. G., Do Nascimento, J. L., Mafra, D., Santos, A. F., & Padilha, C. S. (2023). Anthocyanins-rich interventions on oxidative stress, inflammation and lipid profile in patients undergoing hemodialysis: Meta-analysis and meta-regression. *European Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 316-324.
- Masand, V. H., & Rastija, V. (2017). PyDescriptor: A new PyMOL plugin for calculating thousands of easily understandable molecular descriptors. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 169, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.08.003>
- Mateus, N., & de Freitas, V. (2008). Anthocyanins as Food Colorants. En C. Winefield, K. Davies, & K. Gould (Eds.), *Anthocyanins* (pp. 284-304). Springer.
- Matsufuji, T., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M., & Takeda, M. (2003). Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3157-3161.
- Matta, C. F., & Hernández-Trujillo, J. (2003). Bonding in polycyclic aromatic hydrocarbons in terms of the electron density and of electron delocalization. *Journal of Physical Chemistry A*, 107(38), 7496-7504. <https://doi.org/10.1021/jp034952d>

- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: a comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*, 25(17), 3809.
- Mauri, A., Consonni, V., & Todeschini, R. (2016). Molecular Descriptors. En J. Leszczynski (Ed.), *Handbook of Computational Chemistry* (pp. 1-29). Springer.
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25(3), 207–225.
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097–1102.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., & Holub, B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7731-7737.
- McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5896-5904.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage--stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285-1294.
- McGhie, T.K., & Walton, M.C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 702-713.
- McGhie, T. K., & Stevenson, D. E. (2013). Bioavailability and bioabsorption of anthocyanins. En T. C. Wallace & M. M. Giusti (Eds.), *Anthocyanins in Health and Disease* (pp. 91-114). CRC Press.
- McLean, A. D., & Chandler, G. S. (1980). Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11-18. *Journal of Chemical Physics*, 72, 5639-5648.
- Meira, M., Pereira da Silva, E., David, J. M., & David, J. P. (2012). Review of the genus Ipomoea: Traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(4), 682-713.
- Mercader, A. G., & Pomilio, A. B. (2010). QSAR study of flavonoids and biflavonoids as influenza H1N1 virus neuraminidase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5), 1724-1730.
- Mercader, A. G., & Pomilio, A. B. (2011). *Biflavonoids: Occurrence, Structural Features and Bioactivity*. Nova Science Publishers.
- Mercader, A. G., & Pomilio, A. B. (2012a). 2D- and 3D-QSAR studies of flavonoids, biflavones and chalcones: antiviral, antibacterial, antifungal, and antimycobacterial activities. *Anti-Infective Agents*, 10(1), 41-54.
- Mercader, A. G., & Pomilio, A. B. (2012b). (Iso)Flav(an)ones, chalcones, catechins, and theaflavins as anticarcinogens: Mechanisms, anti-multidrug resistance and QSAR studies. *Current Medicinal Chemistry*, 19(26), 4324-4347.
- Mercader, A. G., & Pomilio, A. B. (2013). Naturally-occurring dimers of flavonoids as anticarcinogens. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(8), 1217-1235.
- Merino, G., Vela, A., & Heine, T. (2005). Description of electron delocalization via the analysis of molecular fields. *Chemical Reviews*, 105(10), 3812-3841. <https://doi.org/10.1021/cr030086p>

- Messier, S. P., Gutekunst, D. J., Davis, C., & DeVita, P. (2005). Weight loss reduces knee-joint loads in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 52(7), 2026-2032. <https://doi.org/10.1002/art.21139>
- Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6887-6892.
- Miertus, S., Scrocco, E., & Tomasi, J. (1981). Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Journal of Chemical Physics*, 55, 117-129.
- Miguel, M.G. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 7-15.
- Milbury, P.E., Vita, J.A., & Blumberg, J.B. (2010). Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice. *Journal of Nutrition*, 140, 1099-1104.
- Miller, G. D., Nicklas, B. J., & Loeser, R. F. (2008). Inflammatory biomarkers and physical function in older, obese adults with knee pain and self-reported osteoarthritis after intensive weight-loss therapy. *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(4), 644-651. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2007.01636.x>
- Mirabel, M., Saucier, C., Guerra, C., & Glories, Y. (1999). Copigmentation in model wine solutions: Occurrence and relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 211-218.
- Miron, A., Aprotosoiaie, A. C., Trifan, A., & Xiao, J. (2017). Flavonoids as modulators of metabolic enzymes and drug transporters. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398(1), 152-167. <https://doi.org/10.1111/nyas.13384>
- Mitra, S., Lami, M. S., Uddin, T. M., et al. (2022). Prospective multifunctional roles and pharmacological potential of dietary flavonoid narirutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 112932. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112932>
- Mohammadi Pour, P., Fakhri, S., Asgary, S., Farzaei, M. H., & Echeverria, J. (2019). The signaling pathways, and therapeutic targets of antiviral agents: Focusing on the antiviral approaches and clinical perspectives of anthocyanins in the management of viral diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1207. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01207>
- Mohammadi, N., Farrell, M., O'Sullivan, L., Langan, A., Franchin, M., Azevedo, L., & Granato, D. (2024). Effectiveness of anthocyanin-containing foods and nutraceuticals in mitigating oxidative stress, inflammation, and cardiovascular health-related biomarkers: A systematic review of animal and human interventions. *Food & Function*, 15(4), 3274-3299.
- Mohanraj, R., & Sivasankar, S. (2014). Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)--A valuable medicinal food: A review. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 733-741.
- Molaeafard, S., Jamei, R., & Marjani, A. P. (2020). Co-pigmentation of anthocyanins extracted from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) with some organic acids: Color intensity, thermal stability, and thermodynamic parameters. *Food Chemistry*, 339, 128070.
- Molagoda, I. M. N., Lee, K. T., Choi, Y. H., & Kim, G. Y. (2020). Anthocyanins from *Hibiscus syriacus* L. inhibit oxidative stress-mediated apoptosis by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Antioxidants*, 9(1), 42.
- Moncada, M.C., Moura, S., Melo, M.J., Roque, A., Lodeiro, C., & Pina, F. (2003). Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts: A source for blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta*, 356(1), 51-61.

- Montilla, E. C., Hillebrand, S., Butschbach, D., Baldermann, S., Watanabe, N., & Winterhalter, P. (2010). Preparative isolation of anthocyanins from Japanese purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(18), 9899-9904.
- Moon, Y. J., Wang, X., & Morris, M. E. (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, *20*(2), 187-210. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.048>
- Morales-Luna, E., Pérez-Ramírez, I. F., Salgado, L. M., Castaño-Tostado, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Reynoso-Camacho, R. (2019). The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(2), 596-605. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9220>
- Morata, A., López, C., Tesfaye, W., González, C., & Escott, C. (2019). Anthocyanins as Natural Pigments in Beverages. En *Value Added Ingredients and Enrichments of Beverages*, *14*, 383-428. Academic Press.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3380.
- Musarra-Pizzo, M., Pennisi, R., Ben-Amor, I., Mandalari, G., & Sciortino, M. T. (2021). Antiviral activity exerted by natural products against human viruses. *Viruses*, *13*(5), 828. <https://doi.org/10.3390/v13050828>
- Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., Bhat, Z. F., & Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. *Food Bioscience*, *52*, 102403.
- Nagy, I. Z. (2001). On the true role of oxygen free radicals in the living state, aging, and degenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *928*(1), 187-199.
- Naseri, R., Farzaei, F., Haratipour, P., Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Farzaei, M. H., Khodarahmi, R., Tewari, D., & Momtaz, S. (2018). Anthocyanins in the management of metabolic syndrome: A pharmacological and biopharmaceutical review. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 1310. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01310>
- Nassour, R., Ayash, A., & Al-Tameemi, K. (2020). Anthocyanin pigments: structure and biological importance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 45-57.
- National Cancer Institute Dictionary of Cancer Terms. Available online: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/> (accessed on 25 September 2024).
- Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., et al. (2010). Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, *2010*, bap024.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., & Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *46*(2), 161-183.

- Nikkhah, M., Khayami, R., & Heidari, R. (2008). In vitro screening for antioxidant activity and cancer suppressive effect on blackberry (*Morus nigra*). *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 1, 167-172.
- Nikkhah, E., Khayami, M., & Heidari, R. (2009). Evaluation of nitric oxide scavenging activity of anthocyanins from blackberry (*Morus nigra* L.), strawberry (*Fragaria vesca* L.) and berry (*Morus alba* L. var. *nigra*) extracts. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 25(2), 120-128.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., & Packer, L. (1998). Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 102(2), 175-187.
- Nørbæk, R., Brandt, K., Nielsen, J. K., Ørgaard, V., & Jacobsen, N. (2002). Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(8), 763-791.
- Oancea, S., & Draghici, O. (2013). pH and thermal stability of anthocyanin-based optimised extracts of Romanian red onion cultivars. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 283-291.
- O'Brien, S. E., & Popelier, P. L. A. (1999). Quantum molecular similarity. Part 2: The relation between properties in BCP space and bond length. *Canadian Journal of Chemistry*, 77, 28-36. <https://doi.org/10.1139/v98-215>
- Ockermann, P., Headley, L., Lizio, R., & Hansmann, J. (2021). A review of the properties of anthocyanins and their influence on factors affecting cardiometabolic and cognitive health. *Nutrients*, 13(8), 2831. <https://doi.org/10.3390/nu13082831>
- OECD. (2007). *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models*. OECD Publishing.
- Ohno, H., Araho, D., Uesawa, Y., Kagaya, H., Ishihara, M., Sakagami, H., & Yamamoto, M. (2013). Evaluation of cytotoxicity and tumor-specificity of licorice flavonoids based on chemical structure. *Anticancer Research*, 33(7), 3061-3068.
- Oki, T., Suda, I., Terahara, N., Sato, M., & Hatakeyama, M. (2006). Determination of acylated anthocyanin in human urine after ingesting a purple-fleshed sweet potato beverage with various contents of anthocyanin by LC-ESI-MS/MS. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(11), 2540-2543.
- Oliveira, J., Azevedo, J., Teixeira, N., Araújo, P., de Freitas, V., Basílio, N., & Pina, F. (2021). On the limits of anthocyanins co-pigmentation models and respective equations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(4), 1359-1367.
- Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, A., & Duan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7264-7271.
- Open Babel for Windows. (n.d.). Recuperado de <http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>
- Ortiz, E. V., Bennardi, D. O., Bacelo, D. E., Fioressi, S. E., & Duchowicz, P. R. (2017). The conformation independent QSPR approach for predicting the oxidation rate constant of water micropollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(35), 27366-27375. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0315-5>

- Ortiz de Montellano, P. R., & De Voss, J. J. (2005). Substrate oxidation by Cytochrome P450 enzymes. En *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (3ra ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. https://doi.org/10.1007/0-387-27447-2_6
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., Saldarriaga, M., & Díaz, A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 233-241.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Oyama, K., Yoshida, K., & Kondo, T. (2011). Recent progress in the synthesis of flavonoids: From monomers to supra-complex molecules. *Current Organic Chemistry*, 15(15), 2567-2607.
- Oyama, K., Yamada, T., Ito, D., Kondo, T., & Yoshida, K. (2015). Metal complex pigment involved in the blue sepal color development of *Hydrangea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(33), 7630-7635.
- Ozkan, M. (2002). Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry*, 78(4), 499-504.
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494-506.
- PaDEL 2.20 (Pharmaceutical Data Exploration Laboratory). (n.d.). Recuperado de <http://www.yapcwsoft.com>
- Paiva, E. A., & Martins, L. C. (2014). Structure of the receptacular nectary and circadian metabolism of starch in the ant-guarded plant *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). *Plant Biology*, 16(2), 244-251.
- Palé, E., Nacro, M., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R., & Ottinger, R. (1998). Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomoea asarifolia*. *Phytochemistry*, 48(8), 1433-1437.
- Palé, E., Kouda-Bonafos, M., Nacro, M., Vanhaelen, M., & Vanhaelen-Fastré, R. (2003). Two triacylated and tetraglucosylated anthocyanins from *Ipomoea asarifolia* flowers. *Phytochemistry*, 64(8), 1395-1399.
- Pan, J. T., Yu, B. W., Yin, Y. Q., Li, J. H., Wang, L., Guo, L. B., & Shen, Z. B. (2015). Four new pentasaccharide resin glycosides from *Ipomoea cairica* with strong α -glucosidase inhibitory activity. *Molecules*, 20(4), 6601-6610.
- Park, E., Edirisinghe, I., Wei, H., Vijayakumar, L. P., Banaszewski, K., Cappozzo, J. C., & Burton-Freeman, B. (2016). A dose-response evaluation of freeze-dried strawberries independent of fiber content on metabolic indices in abdominally obese individuals with insulin resistance in a randomized, single-blinded, diet-controlled crossover trial. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(5), 1099-1109. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500845>
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J. N., Wang, J. Y., & Yu, L. L. (2006). Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3773-3778.
- Páska, C., Innocenti, G., Ferlin, M., Kunvári, M., & László, M. (2002). Pinoresinol from *Ipomoea cairica* cell cultures. *Natural Product Letters*, 16(5), 359-363.

- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, *544*, 210-213.
- Passeri, V., Koes, R., & Quattrocchio, F. M. (2016). New challenges for the design of high value plant products: Stabilization of anthocyanins in plant vacuoles. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 153.
- Patras, A., Brunton, N., O'Donnell, C., & Tiwari, B. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(1), 3-11.
- Pazmino-Duran, A. E., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., & Gloria, B. A. (2001). Anthocyanins from *oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, *75*(2), 211-216.
- Pearle, A. D., Scanzello, C. R., George, S., Mandl, L. A., DiCarlo, E. F., Peterson, M., Sculco, T. P., & Crow, M. K. (2007). Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *15*(5), 516-523. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.10.010>
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, D. B. M., Pezzuto, J. M., & Kinghorn, A. D. (1993). Tricolorin A, major phytochemical inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products*, *56*(4), 571-582.
- Pereira, G. K., Donate, P. M., & Galembeck, S. E. (1996). Electronic structure of hydroxylated derivatives of the flavylum cation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *363*, 87-96.
- Pereira, G. K., Donate, P. M., & Galembeck, S. E. (1997). Effects of substitution for hydroxyl in the B-ring of the flavylum cation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *392*, 169-179. [https://doi.org/10.1016/s0166-1280\(97\)90395-x](https://doi.org/10.1016/s0166-1280(97)90395-x)
- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A., & Andrade, P.B. (2009). Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, *14*, 2202-2211.
- Petroni, K., & Tonelli, C. (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science*, *181*(3), 219-229.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pina, M.J., Melo, C.A.T., Laia, C.A.T., Parola, A.J., & Lima, J.C. (2012). Chemistry and applications of flavylum compounds: A handful of colours. *Chemical Society Reviews*, *41*, 869-908. <https://doi.org/10.1039/c1cs15126f>
- Pino, Q. M. T., & Vergara, H. C. (Eds.). (2022). *Colorantes y Antioxidantes Naturales en la Industria de Alimentos: Tecnologías de Extracción y Materias Primas Dedicadas*. Boletín INIA N°455. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile. 184 pp. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/68518>
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemical Analysis and Biochemistry*, *1*, 106.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., et al. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, Article ID 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021a). Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays. *Molecules*, *26*(5), 1244.

- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021b). How does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay? *Antioxidants*, *10*(6), 811.
- Platzer, M., Kiese, S., Tybussek, T., Herfellner, T., Schneider, F., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2022). Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: A quantitative structure-property relationship (QSPR) study. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 882458.
- Pomilio, A. B., & Sproviero, J. F. (1972a). Acylated anthocyanins from *Ipomoea cairica*. *Phytochemistry*, *11*(3), 1125-1128.
- Pomilio, A. B., & Sproviero, J. F. (1972b). Complex anthocyanins from *Ipomoea congesta*. *Phytochemistry*, *11*(7), 2323-2326.
- Pomilio, A. B., & Sproviero, J. F. (1972c). Complex anthocyanins from *Ipomoea indivisa*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, *60*(3), 291-297.
- Pomilio, A. B., & Vitale, A. A. (1988). *Métodos Experimentales de Laboratorio en Química Orgánica*. Serie de Química, Monografía No 33, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
- Pomilio, A. B., & Mercader, A. G. (2012). QSAR studies of flavonoids and biflavonoids. En A. Gayathri (Ed.), *New Developments and Applications of QSAR-QSPR Theory* (pp. 1-25). Editorial Research Signpost.
- Pomilio, A.B., & Mercader, A.G. (2017). Natural acylated anthocyanins and other related flavonoids: structure elucidation of *Ipomoea cairica* compounds and QSAR studies including multidrug resistance. In A. Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products* (Vol. Chapter 9). Elsevier Science Publishers.
- Pomilio, A. B., Mercader, A. G., & Duchowicz, P. R. (2019). Quantitative structure–property relationship (QSPR) studies of alcoholic and non-alcoholic beverages, including wines, beers, and citrus juices. En *Engineering Tools in the Beverage Industry: Vol. 3. The Science of Beverages*. Woodhead Publishing, Elsevier Inc.
- Pomilio, A.B., Szewczuk, N.A., & Duchowicz, P.R. (2024). Dietary anthocyanins balance immune signs in osteoarthritis and obesity – update of human in vitro studies and clinical trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *64*(9), 2634-2672. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2124948>
- Popelier, P. L. A., Aicken, F., & O'Brien, S. (2000). Atoms in molecules. In *Chem. Model. Appl. Theory* (pp. 143-198). Royal Society of Chemistry.
- Potter, N. N., & Hotchkiss, J. H. (1995). *Food Science* (5th ed.). Chapman and Hall.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, *88*(4), 1243-1276.
- Pozo-Bayon, M. A., Monagas, M., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Wine features related to safety and consumer health: An integrated perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(1), 31-54.
- Prior, R.L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, *40*(10), 1014-1028.
- Putta, S., Yarla, N.S., Kumar, E.K., Lakkappa, D.B., Kamal, M.A., Scotti, L., Scotti, M.T., Ashraf, G.M., Barreto, G.E., Rao, B.S.B., Kumari, D.S., Reddy, G.V., Tarasov, V.V., Imandi, S.B., & Aliev, G. (2017). Preventive and therapeutic potentials of anthocyanins in diabetes and associated complications. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171206101945>

- Qian, J. Z., Wang, B. C., Fan, Y., Tan, J., & Huang, H. J. (2014). QSAR study of flavonoid-metal complexes scavenging O₂•. *Journal of Coordination Chemistry*, 67(17-18), 2867-2884.
- Qian, J. Z., Wang, B. C., Fan, Y., Tan, J., & Yang, X. (2015). QSAR study of flavonoid-metal complexes and their anticancer activities. *Journal of Structural Chemistry*, 56(2), 338-345.
- Qiao, L. S., He, Y. S., & Zhang, Y. L. (2014). Study on structure-activity relationship of flavonoids' multidrug resistance-associated protein inhibitory activity. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 39(6), 885-890.
- Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y. T., Liu, J., Mou, H. Y., Cao, L., & Ling, W. H. (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 485-492. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27814>
- Qiu, F., Luo, J., Yao, S., Ma, L., & Kong, L. (2009). Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 32(14), 2146-2151.
- Qiu, J., Saito, N., Noguchi, M., Fukui, K., Yoshiyama, K., Matsugano, K., Terehara, N., & Matsui, T. (2011). Absorption of 6-O-caffeoylsophorose and its metabolites in Sprague-Dawley rats detected by electrochemical detector-high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-time-of-flight-mass spectrometry methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6299-6304.
- Rabelo, A. C. S., Guerreiro, C. de A., Shinzato, V. I., et al. (2023). Anthocyanins Reduce Cell Invasion and Migration through Akt/mTOR Downregulation and Apoptosis Activation in Triple-Negative Breast Cancer Cells: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/cancers15082300>
- Rahman, M. M., Ichianagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y., & Konishi, T. (2006). Superoxide radical-and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radical Research*, 40(9), 993-1002.
- Rahman, S., Mathew, S., Nair, P., Ramadan, W. S., & Vazhappilly, C. G. (2021). Health benefits of cyanidin-3-glucoside as a potent modulator of Nrf2-mediated oxidative stress. *Inflammopharmacology*, 29(3), 907-923.
- Rajan, V. K., Hasna, C. K., & Muraleedharan, K. (2018). The natural food colorant Peonidin from cranberries as a potential radical scavenger - A DFT based mechanistic analysis. *Food Chemistry*, 262, 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.074>
- Rajan, V. K., Ragi, C., & Muraleedharan, K. (2019). A computational exploration into the structure, antioxidant capacity, toxicity and drug-like activity of the anthocyanidin "Petunidin". *Heliyon*, 5(7), e02115. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02115>
- Rajkumar, S., & Jebanesan, A. (2007). Repellent activity of selected plant essential oils against the malarial fever mosquito *Anopheles stephensi*. *Tropical Biomedicine*, 24(1), 71-75.
- Ralte, V. (2014). Evaluation of phytochemical contents of *Ipomoea cairica* (L.) Sweet - A qualitative approach. *Science Vision*, 14(3), 145-151.
- Ramirez-Tortosa, O.M., Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R., & Duthie, G.G. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1033-1037.
- Randié, M. (1996). Molecular bonding profiles. *Journal of Mathematical Chemistry*, 19(4), 375-392.

- Ranganathan, S., Halagowder, D., & Sivasithambaram, N. D. (2015). Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *PLOS ONE*, *10*(10), e0141370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141370>
- Ranjha, M. M. A. N., Shafique, B., Wang, L., Irfan, S., Safdar, M. N., Murtaza, M. A., Nadeem, M., Mahmood, S., Mueen-ud-Din, G., & Nadeem, H. R. (2021). A comprehensive review on phytochemistry, bioactivity and medicinal value of bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum*). *Advances in Traditional Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00566-7>
- Rasheed, Z., Akhtar, N., & Haqqi, T. M. (2010). Pomegranate extract inhibits the interleukin-1 β -induced activation of MKK-3, p38 α -MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy*, *12*(5), R195. <https://doi.org/10.1186/ar3166>
- Rashwan, A. K., Karim, N., Xu, Y., Xie, J., Cui, H., Mozafari, M. R., & Chen, W. (2023). Potential micro-/nano-encapsulation systems for improving stability and bioavailability of anthocyanins: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(19), 3362-3385.
- Ray, S., & Manna, A. K. (2013). QSAR modeling of aldose reductase inhibitory activity of flavonoid compounds using electrotopological state atom parameter (E-state). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *6*(Suppl. 1), 140-145.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.
- Rechner, A.R., & Kroner, C. (2005). Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research*, *116*, 327-334.
- Record, I. R., Dreosti, I. E., & McInerney, J. K. (2001). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *British Journal of Nutrition*, *85*(4), 459-464.
- Reed, A. E., Curtiss, L. A., & Weinhold, F. (1988). Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor—acceptor viewpoint. *Chemical Reviews*, *88*(6), 899-926.
- Reed, L., Arlt, V. M., & Phillips, D. H. (2018). The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: An in vivo-in vitro paradox. *Carcinogenesis*, *39*(7), 851-859. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy058>
- Reginato, A. M., Riera, H., Vera, M., Torres, A. R., Espinosa, R., Esquivel Valerio, J. A., Felipe, O. J., Blas, J. R., Rillo, O., Papasidero, S., et al. (2015). Osteoarthritis in Latin America study of demographic and clinical characteristics in 3040 patients. *Journal of Clinical Rheumatology*, *21*(8), 391-397. <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000281>
- Rein, E., Kharazmi, A., & Winther, K. (2004). A herbal remedy, Hyben Vital (stand. powder of a subspecies of *Rosa canina* fruits), reduces pain and improves general wellbeing in patients with osteoarthritis: A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Phytomedicine*, *11*(5), 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.01.001>
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. University of Helsinki, Helsinki, Finland. pp. 10-14.
- Remini, H., Dahmoune, F., Sahraoui, Y., Madani, K., Kapranov, V., & Kiselev, E. (2018). Recent advances on stability of anthocyanins. *Vestnik RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, *13*(3), 257-286.

- Renis, M., Calandra, L., Scifo, C., Tomasello, B., Cardile, V., Vanella, L., Bei, R., Fauci, L. L., & Galvano, F. (2007). Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins. *British Journal of Nutrition*, 1-9.
- Revilla, E., Garcia-Benítez, E., Cabello, F., Martin-Ortega, G., & Ryan, J. M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), 53-60.
- Remini, H., Dahmoune, F., Sahraoui, Y., Madani, K., Kapranov, V., & Kiselev, E. (2018). Recent advances on stability of anthocyanins. *Vestnik RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 13(3), 257-286.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. de O., & de Jong, E. V. (2014). Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 111-116.
- Revilla, E., Garcia-Benítez, E., Cabello, F., Martin-Ortega, G., & Ryan, J. M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915(1-2), 53-60.
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & Saad, B. (2016). Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and Therapeutic Aspects. En *Biosynthesis and Stability of Anthocyanins* (pp. 71-86). Springer.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Robards, K., & Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review. *Analyst*, 122(1), 11R-34R.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2019). Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200-205.
- Rojas, C., Duchowicz, P. R., Tripaldi, P., & Pis Diez, R. (2015). Quantitative structure-property relationship analysis for the retention index of fragrance-like compounds on a polar stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1422, 277-288. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.028>
- Rojas, C. X., Duchowicz, P. R., Pis Diez, R., & Tripaldi, P. (2016). Applications of Quantitative Structure-Relative Sweetness Relationships in Food Chemistry. En A. G. Mercader, P. R. Duchowicz, & P. M. Sivakumar (Eds.), *Chemometrics Applications and Research: QSAR in Medicinal Chemistry* (pp. 317-339). Apple Academic Press.
- Rong-Jyh, L., Chung-Yi, C., & Wen-Li, L. (2008). Cytotoxic activity of *Ipomoea cairica*. *Natural Product Research*, 22(8), 747-753.
- Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, 187(2), 363-371.
- Ross, J.A., & Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Rossetto, M., Vanzani, P., Lunelli, M., Scarpa, M., Mattivi, F., & Rigo, A. (2007). Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates. *Free Radical Research*, 41(8), 854-859.
- Roy, S., Khanna, S., Alessio, H. M., Vider, J., Bagchi, D., Bagchi, M., & Sen, C. K. (2002). Anti-angiogenic property of edible berries. *Free Radical Research*, 36(9), 1023-1032.

- Roy, P., Paul, S., Mitra, I., & Roy, K. (2009). On two novel parameters for validation of predictive QSAR models. *Molecules*, *14*(5), 1660-1701. <https://doi.org/10.3390/molecules14051660>
- Roy, K., Chakraborty, P., Mitra, I., Ojha, P. K., Kar, S., & Das, R. N. (2013). Some case studies on application of “r²m” metrics for judging quality of Quantitative Structure–Activity Relationship predictions: Emphasis on scaling of response data. *Journal of Computational Chemistry*, *34*(12), 1071-1082. <https://doi.org/10.1002/jcc.23231>
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015a). *A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts* (Springer Briefs in Molecular Sciences).
- Roy, K., Kar, S., & Ambure, P. (2015b). On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *145*, 22-29.
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015c). *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. Academic Press.
- Roy, K., Das, R. N., Ambure, P., & Aher, R. B. (2016). Be aware of error measures. Further studies on validation of predictive QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *152*, 18-33. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2016.01.008>
- Rücker, C., Rücker, G., & Meringer, M. (2007). Y-Randomization and its variants in QSPR/QSAR. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *47*(6), 2345-2357. <https://doi.org/10.1021/ci700157b>
- Rugina, Z., Sconta, Z., Leopold, L., Pintea, A., Bunea, A., & Socaciu, C. (2012). Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. *Journal of Medicinal Food*, *15*, 700-706.
- Saalfeld, W., Mixon, A. M., Zelig, J., & Lydon, E. J. (2021). Differentiating psoriatic arthritis from osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A narrative review and guide for advanced practice providers. *Rheumatology and Therapy*, *8*(4), 1493-1517. <https://doi.org/10.1007/s40744-021-00365-1>
- Sachan, S., Tiwari, S., & Tiwari, S. K. (2014). QSAR study of flavonoids analogues as in vivo anticancer BCRP inhibition bio-activity. *International Journal of PharmTech Research*, *6*(4), 1687-1694.
- Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2024). Antioxidant Activity of Anthocyanins and Anthocyanidins: A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(22), 12001. <https://doi.org/10.3390/ijms252212001>
- Saha, S., Singh, J., Paul, A., Sarkar, R., Khan, Z., & Banerjee, K. (2020). Anthocyanin profiling using UV-Vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, *103*(1), 23-39.
- Saito, N., & Harborne, J.B. (1992). Correlations between anthocyanin type, pollinator and flower colour in the labiatae. *Phytochemistry*, *31*, 3009–3015.
- Saito, N., Lu, T. S., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1993). An acylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside in the violet-blue flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, *33*(1), 245-247.
- Saito, N., Lu, T. S., Akaizawa, M., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1994). Acylated pelargonidin glucosides in the maroon flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, *35*(2), 407-411.
- Saito, N., Ku, M., Tatsuzawa, F., Lu, T. S., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1995). Acylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, *40*(5), 1523-1529.

- Saito, N., Tatsuzawa, F., Kasahara, K., Yokoi, M., Iida, S., & Shigihara, A. (1996a). Acylated peonidin glycosides in the slate flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, *41*(6), 1607-1611.
- Saito, N., Tatsuzawa, F., Yokoi, M., Kasahara, K., Iida, S., Shigihara, A., & Honda, T. (1996b). Acylated pelargonidin glycosides in red-purple flowers of *Ipomoea purpurea*. *Phytochemistry*, *43*(7), 1365-1370.
- Saito, N., Tatsuzawa, F., Kasahara, K., Iida, S., & Honda, T. (1998). Acylated cyanidin 3-sophorosides in the brownish-red flowers of *Ipomoea purpurea*. *Phytochemistry*, *49*(3), 875-880.
- Saito, N., Toki, K., Morita, Y., Hoshino, A., Iida, S., Shigihara, A., & Honda, T. (2005). Acylated peonidin glycosides from duskish mutant flowers of *Ipomoea nil*. *Phytochemistry*, *66*(16), 1852-1860.
- Sakata, K., Saito, N., & Honda, T. (2006). Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins. *Tetrahedron*, *62*(15), 3721-3731. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.01.081>
- Sakuta, M. (2014). Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnology Reports*, *8*(1), 37-48.
- Salamon, I., Şimşek Sezer, E. N., Kryvtsova, M., & Labun, P. (2021). Antiproliferative and antimicrobial activity of anthocyanins from berry fruits after their isolation and freeze-drying. *Applied Sciences*, *11*, 2096. <https://doi.org/10.3390/app11052096>
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J. P., & Cheynier, V. (2004). Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, *513*(1), 325-332.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Cappellini, F., Reiner, Ž., Zorzan, D., Imran, M., Sener, B., Kilic, M., El-Shazly, M., Fahmy, N. M., et al. (2020). The therapeutic potential of anthocyanins: Current approaches based on their molecular mechanism of action. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 1300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01300>
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, *10*(1), 118.
- Sánchez-Jiménez, F., Ruiz-Pérez, M. V., Urdiales, J. L., & Medina, M. A. (2013). Pharmacological potential of biogenic amine-polyamine interplay beyond neurotransmission. *British Journal of Pharmacology*, *170*(1), 4-16. <https://doi.org/10.1111/bph.12109>
- Sandoval-Ramírez, B. A., Catalán, Ú., Llauradó, E., Valls, R. M., Salamanca, P., Rubió, L., Yuste, S., & Sola, R. (2022). The health benefits of anthocyanins: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and controlled clinical trials. *Nutrition Reviews*, *80*(12), 1515-1530.
- Santamarina, A. B., Jamar, G., Mennitti, L. V., de Cássia César, H., de Rosso, V. V., Vasconcelos, J. R., Oyama, L. M., & Pellegrini Pisani, L. (2018). Supplementation of juçara berry (*Euterpe edulis* Mart.) modulates epigenetic markers in monocytes from obese adults: A double-blind randomized trial. *Nutrients*, *10*(12), 1899. <https://doi.org/10.3390/nu10121899>
- Santamarina, A. B., Jamar, G., Mennitti, L. V., de Cássia Cesar, H., Vasconcelos, J. R., Oyama, L. M., de Rosso, V. V., & Pellegrini Pisani, L. (2020). Obesity-related inflammatory modulation by juçara berry (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation in Brazilian adults: A double-blind randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, *59*(4), 1693-1705. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02024-2>

- Santhanakrishnan, V. P., Varun, E., Banday, J. A., et al. (2020). Studies on the in vitro anticancer activity of mangostin and acetylated mangostin against MCF-7 cell lines. *Chemistry Data Collections*, 28, Article 100476. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100476>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. IntechOpen.
- Sarma, A. D., & Sharma, R. (1999). Anthocyanin-DNA copigmentation complex: Mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry*, 52(6), 1313-1318.
- Satake, R., & Yanase, E. (2018). Mechanistic studies of hydrogen-peroxide-mediated anthocyanin oxidation. *Tetrahedron*, 74(41), 6187-6191.
- Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguerre, M., & Glories, Y. (1997). (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry*, 46(2), 229-234.
- Saulite, L., Jekabsons, K., Klavins, M., Muceniece, R., & Riekstina, U. (2019). Effects of malvidin, cyanidin and delphinidin on human adipose mesenchymal stem cell differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. *Phytomedicine*, 53, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.029>
- Sayago-Ayerdi, S., García-Martínez, D. L., Ramírez-Castillo, A. C., Ramírez-Concepción, H. R., & Viuda-Martos, M. (2021). Tropical fruits and their co-products as bioactive compounds and their health effects: A review. *Foods*, 10(8), 1952. <https://doi.org/10.3390/foods10081952>
- Scanu, A., Tognolo, L., Maccarone, M. C., & Masiero, S. (2021). Immunological events, emerging pharmaceutical treatments and therapeutic potential of balneotherapy on osteoarthritis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 681871. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.681871>
- Schell, J., Hal Scofield, R., Barrett, J. R., Kurien, B. T., Betts, N., Lyons, T. J., Zhao, Y. D., & Basu, A. (2017). Strawberries improve pain and inflammation in obese adults with radiographic evidence of knee osteoarthritis. *Nutrients*, 9(9), 949. <https://doi.org/10.3390/nu9090949>
- Schröder, H. C., Merz, H., Steffen, R., Müller, W. E., Sarin, P. S., Trumm, S., Schulz, J., & Eich, E. (1990). Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 45(11-12), 1215-1221.
- Schulz, M., da Silva Campelo Borges, G., Gonzaga, L. V., Oliveira Costa, A. C., & Fett, R. (2016). Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, 89(Part 1), 14-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>
- Schumacher, H. R., Pullman-Mooar, S., Gupta, S. R., Dinnella, J. E., Kim, R., & McHugh, M. P. (2013). Randomized double-blind crossover study of the efficacy of a tart cherry juice blend in treatment of osteoarthritis (OA) of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(8), 1035-1041. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.05.009>
- Schwarz, M., Wabnitz, T. C., & Winterhalter, P. (2003). Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3682-3687.
- Schwarz, M., Hofmann, G., & Winterhalter, P. (2004a). Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: Factors influencing the formation of Pinotin A and its correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 498-504.
- Schwarz, M., Wray, V., & Winterhalter, P. (2004b). Isolation and identification of novel pyranoanthocyanins from black carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17), 5095-5101.

- Seeram, N. P., & Nair, M. G. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure– activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(19), 5308-5312.
- Selvaraj, C., Tripathi, S. K., Reddy, K. K., & Singh, S. K. (2011). Tool development for prediction of pIC50 values from the IC50 values—a pIC50 value calculator. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *5*(4), 1104-1109.
- Seo, B.-B., Kwon, Y., Kim, J., Hong, K. H., Kim, S.-E., Song, H.-R., Kim, Y.-M., & Song, S.-C. (2021). Injectable polymeric nanoparticle hydrogel system for long-term anti-inflammatory effect to treat osteoarthritis. *Bioactive Materials*, *7*, 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.028>
- Sharda, S., & Kokate, C. K. (1979). Indole alkaloids from the leaves of *Ipomoea palmata* Forsk. *Indian Drugs*, *17*(2), 70-71.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, *113*(4), 1202-1205.
- Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K., & Singh, I. P. (2016). Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*, *190*, 808-817.
- Sharma, L. (2021). Osteoarthritis of the knee. *New England Journal of Medicine*, *384*(1), 51-59. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1903768>
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., et al. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, *383*, Article 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Sheraz, M., Khan, M., Ahmed, S., Kazi, S., & Ahmad, I. (2015). Stability and Stabilization of Ascorbic Acid. *Household and Personal Care Today*, *10*(4), 20-25.
- Shi, N., Chen, X., & Chen, T. (2021). Anthocyanins in colorectal cancer prevention review. *Antioxidants*, *10*(10), Article 1600. <https://doi.org/10.3390/antiox10101600>
- Shi, A., Liu, L., Li, S., & Qi, B. (2024). Natural products targeting the MAPK-signaling pathway in cancer: Overview. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *150*(6), Article 05572-7. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-05572-7>
- Shih, P. H., Yeh, C. T., & Yen, G. C. (2005). Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, *43*(10), 1557-1566.
- Shih, P. H., Yeh, C. T., & Yen, G. C. (2007). Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress induced apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(23), 9272-9287.
- Shityakov, S., Puskás, I., Roewer, N., Förster, C., & Broscheit, J. (2014). Three-dimensional quantitative structure-activity relationship and docking studies in a series of anthocyanin derivatives as cytochrome P450 3A4 inhibitors. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, *7*, 11-21. <https://doi.org/10.2147/AABC.S56478>
- Sidir, I., Sidir, Y. G., Kumalar, M., & Taşal, E. (2010). Ab initio Hartree-Fock and density functional theory investigations on the conformational stability, molecular structure and vibrational spectra of 7-acetoxy-6-(2,3-dibromopropyl)-4,8-dimethylcoumarin molecule. *Journal of Molecular Structure*, *964*, 134-151. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.11.023>

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Sikorski, Z. E. (2018). Book review: Fennema's Food Chemistry (Fifth Edition), Edited by Srinivasan Damodaran and Kirk L. Parkin. 2017. *Journal of Food Biochemistry*, 42, e12483.
- Simmonds, M. S. J. (2003). Flavonoid–insect interactions: Recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, 64(1), 21-30.
- Simunkova, M., Barbierikova, Z., Jomova, K., Hudecova, L., Lauro, P., Alwasel, S. H., Alhazza, I., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2021). Antioxidant vs. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu(II) ions: A ROS-scavenging activity, Fenton reaction and DNA damage study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1619.
- Singh, P., Pandey, K. N., Verma, V., Kumar, V., & Bhartiya, H. P. (2013). Extraction and identification of compound derived from *Ipomoea palmata* through various spectroscopic techniques. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), 95-100.
- Singletary, K. W., Jung, K. J., & Giusti, M. (2007). Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 244-251.
- Sinopoli, A., Calogero, G., & Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 297, 124898.
- Sipahli, S., Mohanlall, V., & Mellem, J. (2017). Stability and degradation kinetics of crude anthocyanin extracts from *H. sabdariffa*. *Food Science and Technology*, 37(2), 209-215.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., & Trombetta, D. (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins: Anthocyanins and human health. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1265-1286.
- Smida, K. B., Belaidi, S., Benbrahim, I., & Boughdiri, S. (2015). Theoretical studies of structure/activity relationships applied to flavone derivatives for drug discovery. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 874-885.
- Socaciu, C. (2008). *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. CRC Press.
- Solverson, P. (2020). Anthocyanin bioactivity in obesity and diabetes: The essential role of glucose transporters in the gut and periphery. *Cells*, 9(11), 2515. <https://doi.org/10.3390/cells9112515>
- Solverson, P. M., Rumpler, W. V., Leger, J. L., Redan, B. W., Ferruzzi, M. G., Baer, D. J., Castonguay, T. W., & Novotny, J. A. (2018). Blackberry feeding increases fat oxidation and improves insulin sensitivity in overweight and obese males. *Nutrients*, 10(8), 1048. <https://doi.org/10.3390/nu10081048>
- Solverson, P. M., Henderson, T. R., Debelo, H., Ferruzzi, M. G., Baer, D. J., & Novotny, J. A. (2019). An anthocyanin-rich mixed-berry intervention may improve insulin sensitivity in a randomized trial of overweight and obese adults. *Nutrients*, 11(12), 2876. <https://doi.org/10.3390/nu11122876>
- Song, B. J., Sapper, T. N., Burtch, C. E., Brimmer, K., Goldschmidt, M., & Ferruzzi, M. G. (2013). Photo- and thermodegradation of anthocyanins from grape and purple sweet potato in model beverage systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1364-1372.
- Sordon, S., Popłoński, J., Milczarek, M., Stachowicz, M., Tronina, T., Kucharska, A. Z., Wietrzyk, J., & Huszcza, E. (2019). Structure–antioxidant–antiproliferative activity relationships of natural C7 and C7–C8 hydroxylated flavones and flavanones. *Antioxidants*, 8(7), 210.

- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., et al. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
- Sousa, A., Araújo, P., Azevedo, J., Cruz, L., Fernandes, I., Mateus, N., & de Freitas, V. (2016). Antioxidant and antiproliferative properties of 3-deoxyanthocyanidins. *Food Chemistry*, 192, 142-148.
- Speciale, A., Anwar, S., Canali, R., Chirafisi, J., Saija, A., Virgili, F., & Cimino, F. (2013). Cyanidin-3-O-glucoside counters the response to TNF-alpha of endothelial cells by activating Nrf2 pathway. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(11), 1979-1987.
- Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., & Saito, K. (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Product Reports*, 20(3), 288-303.
- Stalke, D. (2011). Meaningful structural descriptors from charge density. *Chemistry - A European Journal*, 17(34), 9264-9278. <https://doi.org/10.1002/chem.201100615>
- Starr, M.S., & Francis, F.J. (1973). Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *Journal of Food Science*, 38(6), 1043-1046.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172-6181.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19-38.
- Stoner, G. D., Sardo, C., Apseloff, G., Mullet, D., Wargo, W., Pound, V., Singh, A., Sanders, J., Aziz, R., Casto, B., & Sun, X. (2005). Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45(10), 1153-1164.
- Stote, K. S., Burns, G., Mears, K., Sweeney, M., & Blanton, C. (2023). The effect of berry consumption on oxidative stress biomarkers: A systematic review of randomized controlled trials in humans. *Antioxidants*, 12(7), 1443.
- Strang, A. C., Bisoendial, R. J., Kootte, R. S., Schulte, D. M., Dallinga-Thie, G. M., Levels, J. H. M., Kok, M., Vos, K., Tas, S. W., Tietge, U. J. F., et al. (2013). Pro-atherogenic lipid changes and decreased hepatic LDL receptor expression by tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*, 229(1), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.031>
- Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Matsugano, K., Sugita, K., & Terahara, N. (2002). Direct absorption of acylated anthocyanin in purple-fleshed sweet potato into rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1672-1676.
- Sudha, A., Srinivasan, P., Kanimozhi, V., et al. (2018). Antiproliferative and apoptosis-induction studies of 5-hydroxy 3',4',7-trimethoxyflavone in human breast cancer cells MCF-7: An in vitro and in silico approach. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 38(2), 179-190. <https://doi.org/10.1080/10799893.2018.1468780>
- Suja, K. P., Jayalekshmy, A., & Arumughan, C. (2004). Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (*Sesamum indicum* L.) in DPPH• System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 912-915.
- Sukhikh, S., Noskova, S., Ivanova, S., Ulrikh, E., Izgaryshev, A., & Babich, O. (2021). Chondroprotection and molecular mechanism of action of phytonutraceuticals on osteoarthritis. *Molecules*, 26(8), 2391. <https://doi.org/10.3390/molecules26082391>

- Sun, J., & Mei, H. (2013). Binding site analysis, 3D-QSAR studies, and molecular design of flavonoids derivatives as potent neuraminidase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 22(2), 606-614.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swarup, V., Ghosh, J., Mishra, M. K., & Basu, A. (2008). Novel strategy for treatment of Japanese encephalitis using arctigenin, a plant lignin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 679-688.
- Takao, L. K., Ribeiro, J. P. N., & Lima, M. I. S. (2011). Allelopathic effects of *Ipomoea cairica* (L.) Sweet on crop weeds. *Acta Botanica Brasilica*, 25(4), 858-864.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.L., & Rémésy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition*, 134, 2275-2279.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2005). Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3902-3928.
- Tan, C., Dadmohammadi, Y., Lee, M. C., & Abbaspourrad, A. (2021). Combination of copigmentation and encapsulation strategies for the synergistic stabilization of anthocyanins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 3164-3191.
- Tanaka, Y., & Brugliera, F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120432.
- Teimourinejad, A., Hashemibeni, B., Salehi, H., Mostafavi, F. S., Kazemi, M., & Bahramian, H. (2020). Chondrogenic activity of two herbal products; pomegranate fruit extract and avocado/soybean unsaponifiable. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 15(4), 358-366. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.293514>
- Teles, R. B. de A., Diniz, T. C., Coimbra, T., et al. (2018). Flavonoids as therapeutic agents in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A systematic review of preclinical evidences. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, Article 7043213.
- Tena, N., Martín, J., & Asuero, A. G. (2020). State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. *Antioxidants*, 9(5), 451.
- Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M., & Suzuki, M. (2001). Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry*, 58(3), 493-500.
- Testa, B., & Kier, L. B. (1991). The concept of molecular structure in structure-activity relationship studies and drug design. *Medicinal Research Reviews*, 11(1), 35-48.
- Tewari, S., Sehrawat, R., Nema, P. K., & Kaur, B. P. (2017). Preservation effect of high pressure processing on ascorbic acid of fruits and vegetables: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41, e12319.
- Thankam Finosh, G., & Jayabalan, M. (2013). Reactive oxygen species—Control and management using amphiphilic biosynthetic hydrogels for cardiac applications. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(10), 1134-1146.

- Thiagaletchumi, M., Zuharah, W. F., Ahbi Rami, R., Fadzly, N., Dieng, H., Ahmad, A. H., & AbuBakar, S. (2014). Assessment of residual bio-efficacy and persistence of *Ipomoea cairica* plant extract against *Culex quinquefasciatus* Say mosquito. *Tropical Biomedicine*, 31(3), 466-476.
- Thomas, T. G., Rao, S., & Lal, S. (2004). Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, *Ipomoea cairica* Linn. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57(4), 176-177.
- Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D. P., Steward, W. P., & Gescher, A. J. (2009). Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(1), 201-211. Comment in: Galvano, F., Salamone, F., Nicolosi, A., & Vitaglione, P. (2009). Anthocyanins-based drugs for colon cancer treatment: The nutritionist's point of view. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(3), 431-432.
- Thoppil, R. J., Bhatia, D., Barnes, K. F., Haznagy-Radnai, E., Hohmann, J., Darvesh, A. S., & Bishayee, A. (2012). Black currant anthocyanins abrogate oxidative stress through Nrf2-mediated antioxidant mechanisms in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, 12(10), 1244-1257.
- Thorlund, J. B., Roos, E. M., Goro, P., Ljungcrantz, E. G., Grønne, D. T., & Skou, S. T. (2021). Patients use fewer analgesics following supervised exercise therapy and patient education: An observational study of 16,499 patients with knee or hip osteoarthritis. *British Journal of Sports Medicine*, 55(12), 670-675. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2019-101265>
- Tian, Q., Konczak, I., & Schwartz, S. J. (2005). Probing anthocyanin profiles in purple sweet potato cell line (*Ipomoea batatas* L. cv. Ayamurasaki) by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6503-6509.
- Timberlake, C. F., & Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(3), 97-105.
- Todeschini, R., Consonni, V., & Gramatica, P. (2009). Chemometrics in QSAR. En R. Tauler, B. Walczak, & S. D. Brown (Eds.), *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis* (pp. 129-170). Elsevier.
- Todeschini, R., & Consonni, V. (2009). *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* (Vol. 41). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9783527628766>
- Toki, K., Saito, N., Iida, S., Hoshino, A., Shigihara, A., & Honda, T. (2001). A novel acylated pelargonidin 3-sophoroside-5-glucoside from greyish-purple flowers of the Japanese morning glory. *Heterocycles*, 55(10), 2261-2267.
- Torskangerpoll, K., & Andersen, Ø. M. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89(4), 427-440.
- Tropsha, A. (2010). Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Molecular Informatics*, 29(6-7), 476-488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>
- Trouillas, P., Sancho-Garcia, J. C., Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937-4982.
- Trucillo, P., Campardelli, R., & Reverchon, E. (2020). Liposomes: from Bangham to supercritical fluids. *Processes*, 8(8), 1022.

- Truong, V. D., Deighton, N., Thompson, R. T., McFeeters, R. F., Dean, L. O., Pecota, K. V., & Yencho, G. C. (2010). Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 404-410.
- Tsuda, T., Kato, Y., & Osawa, T. (2000). Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Letters*, 484(2), 207-210.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, 133(7), 2125-2130.
- Tu, J. F., Yang, J. W., Shi, G. X., Yu, Z. S., Li, J. L., Lin, L. L., Du, Y. Z., Yu, X. G., Hu, H., Liu, Z. S., et al. (2021). Efficacy of intensive acupuncture versus sham acupuncture in knee osteoarthritis: A randomized controlled trial. *Arthritis and Rheumatology*, 73(3), 448-458. <https://doi.org/10.1002/art.41584>
- Turker, N., Aksay, S., & Ekiz, H. I. (2004). Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: Shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3807-3813.
- Tute, M. S. (1971). History and Objectives of Quantitative Drug Design. En *Advances in Drug Research* (Vol. 6, pp. 1-32). Academic Press.
- Udani, J. K., Singh, B. B., Singh, V. J., & Barrett, M. L. (2011). Effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. *Nutrition Journal*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-45>
- Umeogaju, F. U., Ephraim-Emmanuel, B. C., Uba, J. O., Bekibele, G. E., Chigozie, N., & Orisakwe, O. E. (2021). Immunomodulatory and mechanistic considerations of Hibiscus sabdariffa (HS) in dysfunctional immune responses: A systematic review. *Frontiers in Immunology*, 12, 550670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.550670>
- Valdés-Martini, J. R., Marrero-Ponce, Y., García-Jacas, C. R., Martínez-Mayorga, K., Barigye, S. J., Vaz d'Almeida, Y. S., & Morell, C. A. et al. (2017). QuBiLS-MAS, open source multi-platform software for atom- and bond-based topological (2D) and chiral (2.5D) algebraic molecular descriptors computations. *Journal of Cheminformatics*, 9(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0211-5>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- van Acker, S. A., de Groot, M. J., van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Donné-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, 9(8), 1305-1312.
- Van Hung, P. (2016). Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(1), 25-35.
- Van Nocker, S., & Ludwig, P. (2003). The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: Conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 4, 50.
- Vareed, S. K., Reddy, M. K., Schutzki, R. E., & Nair, M. G. (2006). Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Sciences*, 78(7), 777-784. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.094>
- Vanhees, K., Vonhögen, I. G. C., van Schooten, F. J., & Godschalk, R. W. L. (2014). You are what you eat, and so are your children: The impact of micronutrients on the epigenetic programming of

offspring. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(2), 271-285. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1427-9>

- Veitch, N. C., & Grayer, R. J. (2008). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 25(3), 555-611.
- Veitch, N. C., & Grayer, R. J. (2011). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 28(11), 1626-1695.
- Veitch, N. C. (2013). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*, 30(7), 988-1027.
- Veronese, N., Koyanagi, A., Stubbs, B., Cooper, C., Guglielmi, G., Rizzoli, R., Punzi, L., Rogoli, D., Caruso, M. G., Rotolo, O., et al. (2019). Mediterranean diet and knee osteoarthritis outcomes: A longitudinal cohort study. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2735-2739. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.11.032>
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., & Fogliano, V. (2007). Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of Nutrition*, 137(9), 2043-2048.
- Vitale, A. A., Bernatene, E. A., Vitale, M. G., & Pomilio, A. B. (2016). New insights of the Fenton reaction using glycerol as experimental model. Effect of O₂, inhibition by Mg²⁺, and oxidation state of Fe. *Journal of Physical Chemistry A*, 120(31), 5435-5445.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>
- Vo, Q. V., Hoa, N. T., Thong, N. M., & Mechler, A. (2021). The hydroperoxyl and superoxide anion radical scavenging activity of anthocyanidins in physiological environments: Theoretical insights into mechanisms and kinetics. *Phytochemistry*, 192, 112968.
- Vyas, B., Singh, M., Kaur, M., Bahia, M. S., Jaggi, A. S., Silakari, O., & Singh, B. (2015). Aldose reductase inhibitors for diabetic complications: Receptor induced atom-based 3D-QSAR analysis, synthesis and biological evaluation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 59, 59-71.
- Vyas, B., Singh, M., Kaur, M., Silakari, O., Bahia, M. S., & Singh, B. (2016). Pharmacophore and docking-based hierarchical virtual screening for the designing of aldose reductase inhibitors: Synthesis and biological evaluation. *Medicinal Chemistry Research*, 25(3), 609-626.
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (Eds.). (2013). *Anthocyanins in health and disease*. CRC Press.
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2015). Anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 6(5), 620-622.
- Wallace, T. C., & Giusti, M. M. (2019). Anthocyanins—Nature's bold, beautiful, and health-promoting colors. *Foods*, 8(11), 550. <https://doi.org/10.3390/foods8110550>
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 304-309.
- Wang, S. Y., & Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5677-5684.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.

- Wang, J., & Mazza, G. (2002). Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 850-857.
- Wang, L. S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269(2), 281-290.
- Wang, L. S., Hecht, S., Carmella, S. G., Yu, N., Larue, B., Henry, C., McIntyre, C., Rocha, C., Lencher, J. F., & Stoner, G. D. (2009). Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer Prevention Research*, 2(1), 84-93.
- Wang, B. C., Qian, J. Z., Fan, Y., & Tan, J. (2014). The QSAR study of flavonoid-metal complexes scavenging •OH free radical. *Journal of Molecular Structure*, 1075, 204-212.
- Wang, H., Wang, Q., Yang, M., Yang, L., Wang, W., Ding, H., Zhang, D., Xu, J., Tang, X., Ding, H., et al. (2018). Histomorphology and innate immunity during the progression of osteoarthritis: Does synovitis affect cartilage degradation? *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1342-1358. <https://doi.org/10.1002/jcp.26011>
- Wang, T., & He, C. (2018). Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 44, 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.10.002>
- Wang, J., Zhao, X., Zheng, J., Herrera-Balandrano, D. D., Zhang, X., Huang, W., & Sui, Z. (2023). In vivo antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* cv. 'Brightwell') anthocyanin extracts. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 24(7), 602-616.
- Warholm, O., Skaar, S., Hedman, E., Mølmen, H. M., & Eik, L. (2003). The effects of a standardized herbal remedy made from a subtype of *Rosa canina* in patients with osteoarthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental*, 64(1), 21-31. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(03)00004-3)
- Waterhouse, A. L. (2001). The phenolic wine antioxidants. En E. Cadenas & L. Parker (Eds.), *Handbook of Antioxidants* (2nd ed., pp. 401-406). Marcel Dekker.
- Weber, F., & Larsen, L. R. (2017). Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. *Food Research International*, 100, 354-365.
- Weinhold, F., & Landis, C. R. (2001). Natural bond orbitals and extensions of localized bonding concepts. *Chemical Education Research and Practice*, 2, 91-104.
- Weinhold, F., & Landis, C. R. (2005). *Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511614569>
- West, M. E., & Mauer, L. J. (2013). Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in solution and powder forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4169-4179.
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Romaszko, J. (2016). The impact of red cabbage fermentation on bioavailability of anthocyanins and antioxidant capacity of human plasma. *Food Chemistry*, 190, 730-740.
- Williams, C. A., & Grayer, R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 21(4), 539-573.
- Winter, A. N., & Bickford, P. C. (2019). Anthocyanins and their metabolites as therapeutic agents for neurodegenerative disease. *Antioxidants*, 8(9), 333. <https://doi.org/10.3390/antiox8090333>

- Winther, K., Apel, K., & Thamsborg, G. (2005). A powder made from seeds and shells of a rose-hip subspecies (*Rosa canina*) reduces symptoms of knee and hip osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, *34*(4), 302-308. <https://doi.org/10.1080/03009740510018624>
- Wold, S., Eriksson, L., & Clementi, S. (2008). Statistical Validation of QSAR Results. *Chemometrics Methods in Molecular Design*, *2*, 309-338. <https://doi.org/10.1002/9783527615452.ch5>
- Wongwichai, T., Teeyakasem, P., Pruksakorn, D., Kongtawelert, P., & Pothacharoen, P. (2019). Anthocyanins and metabolites from purple rice inhibit IL-1 β -induced matrix metalloproteinases expression in human articular chondrocytes through the NF- κ B and ERK/MAPK pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *112*, 108610. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108610>
- Wood, J. R. I., Carine, M. A., Harris, D., Wilkin, P., Williams, B., & Scotland, R. W. (2015). Ipomoea (Convolvulaceae) in Bolivia. *Kew Bulletin*, *70*(1), 31-155.
- Woodford, J. N. (2005). A DFT investigation of anthocyanidins. *Chemical Physics Letters*, *410*(1-3), 182-187. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.05.067>
- Wright, O. R. L., Netzel, G. A., & Sakzewski, A. R. (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the effect of dried purple carrot on body mass, lipids, blood pressure, body composition, and inflammatory markers in overweight and obese adults: The QUENCH trial. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *91*(6), 480-488. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0349>
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, *16*(9), 423-428.
- Wu, X., Pittman, H. E. III, & Prior, R. L. (2004). Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *The Journal of Nutrition*, *134*(10), 2603-2610.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(11), 4069-4075.
- Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., & Xu, X. (2013a). A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *BBA - Biomembranes*, *1828*(11), 2751-2756.
- Wu, T., Yu, Z., Tang, Q., Song, H., Gao, Z., Chen, W., & Zheng, X. (2013b). Honeysuckle anthocyanin supplementation prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food & Function*, *4*(11), 1654-1661.
- Wu, T., Yang, L., Guo, X., Zhang, M., Liu, R., & Sui, W. (2018). Raspberry anthocyanin consumption prevents diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and modulating hepatic lipid metabolism. *Food & Function*, *9*(4), 2112-2120.
- Xu, J., Su, X., Lim, S., Griffin, J., Carey, E., Katz, B., Tomich, J., Smith, J. S., & Wang, W. (2015). Characterisation and stability of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato P40. *Food Chemistry*, *186*, 90-96.
- Xu, C., Marchand, N. E., Driban, J. B., McAlindon, T., Eaton, C. B., & Lu, B. (2020). Dietary patterns and progression of knee osteoarthritis: Data from the Osteoarthritis Initiative. *American Journal of Clinical Nutrition*, *111*(3), 667-676. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz333>

- Xu, Z., Xie, J., Zhang, H., Pang, J., Li, Q., Wang, X., Xu, H., Sun, X., Zhao, H., Yang, Y., et al. (2021). Anthocyanin supplementation at different doses improves cholesterol efflux capacity in subjects with dyslipidemia: A randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 75(2), 345-354. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0609-4>
- Yamasaki, H., Uefuji, H., & Sakihama, Y. (1996). Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332(1), 183-186.
- Yamazaki, H., Shaw, P. M., Guengerich, F. P., & Shimada, T. (1998). Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 11(6), 659-665. <https://doi.org/10.1021/tx970217f>
- Yamuangmorn, S., & Prom-U-Thai, C. (2021). The potential of high-anthocyanin purple rice as a functional ingredient in human health. *Antioxidants (Basel)*, 10(6), 833. <https://doi.org/10.3390/antiox10060833>
- Yang, M., Koo, S. I., Song, W. O., & Chun, O. K. (2011). Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: Review. *Current Medicinal Chemistry*, 18(2), 291-300.
- Yang, R., Yu, L., Zeng, H., Liang, R., Chen, X., & Qu, L. (2012). The interaction of flavonoid-lysozyme and the relationship between molecular structure of flavonoids and their binding activity to lysozyme. *Journal of Fluorescence*, 22(6), 1449-1459.
- Yang, L., Dykes, L., & Awika, J. M. (2014). Thermal stability of 3-deoxyanthocyanidin pigments. *Food Chemistry*, 160, 246-254.
- Yang, P., Yuan, C., Wang, H., Han, F., Liu, Y., Wang, L., & Liu, Y. (2018). Stability of anthocyanins and their degradation products from cabernet sauvignon red wine under gastrointestinal pH and temperature conditions. *Molecules*, 23(2), 354.
- Yang, L., Ling, W., Du, Z., Chen, Y., Li, D., Deng, S., Liu, Z., & Yang, L. (2017). Effects of anthocyanins on cardiometabolic health: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Advances in Nutrition*, 8(5), 684-693.
- Yang, S.-S., Seo, T.-B., & Kim, Y.-P. (2021). Effect of aqua walking exercise on knee joint angles, muscular strength, and visual analogue scale for patients with limited range of motion of the knee. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 17(4), 265-269. <https://doi.org/10.12965/jer.2142432.216>
- Yao, X., Zhu, F., Zhao, Z., Liu, C., Luo, L., & Yin, Z. (2011). Arctigenin enhances chemosensitivity of cancer cells to cisplatin through inhibition of the STAT3 signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 2837-2849.
- Ye, Y., Xu, G., & Li, D. L. (2022). Acridone alkaloids and flavones from the leaves of *Citrus reticulata*. *Natural Product Research*, 36(21), 3644-3650. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1876047>
- Yi, L., Chen, C. Y., Jin, X., Mi, M. T., Yu, B., Chang, H., Chang, H., Ling, W. H., & Zhang, T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*, 584(3), 583-590.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., & Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(6), 1201-1204. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1201>
- Yoshiki, Y., Okubo, K., & Igarashi, K. (1995). Chemiluminescence of anthocyanins in the presence of acetaldehyde and tert-butyl hydroperoxide. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 10(6), 335-338.

- Yoshida, K., Okuno, R., Kameda, K., & Kondo, T. (2002). Prevention of UV-light induced E,Z-isomerization of caffeoyl residues in the diacylated anthocyanin, gentiodelphin, by intramolecular stacking. *Tetrahedron Letters*, 43(34), 6181-6184.
- Yoshida, K., Mori, M., Kawachi, M., Okuno, R., Kameda, K., & Kondo, T. (2003a). A UV-B resistant polyacylated anthocyanin, HBA, from blue petals of morning glory. *Tetrahedron Letters*, 44(42), 7875-7880.
- Yoshida, K., Okuno, R., Kameda, K., Mori, M., & Kondo, T. (2003b). Influence of E,Z-isomerization and stability of acylated anthocyanins under the UV irradiation. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 163-169.
- Yoshida, K., Osanai, M., & Kondo, T. (2003c). Mechanism of dusky reddish-brown "kaki" color development of Japanese morning glory, *Ipomoea nil* cv. Danjuro. *Phytochemistry*, 63(6), 721-726.
- Yoshida, K., Kitahara, S., Ito, D., & Kondo, T. (2006). Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry*, 67(10), 992-998.
- Yoshida, K., Mori, M., & Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: From chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*, 26(7), 884-915. <https://doi.org/10.1039/b800165k>
- Yoshida, K., & Negishi, T. (2013). The identification of a vacuolar iron transporter involved in the blue coloration of cornflower petals. *Phytochemistry*, 94, 60-67.
- Yoshida, K., Tojo, K., Mori, M., Yamashita, K., Kitahara, S., Noda, M., & Uchiyama, S. (2015). Chemical mechanism of petal color development of *Nemophila menziesii* by a metalloanthocyanin, nemophilin. *Tetrahedron*, 71(47), 9123-9130.
- Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M., & Yamakawa, O. (2001). Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(7), 1652-1655.
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2015). Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2223-2230.
- Yu, B., Luo, J., Wang, J., Zhang, D., Yu, S., & Kong, L. (2013). Pentasaccharide resin glycosides from *Ipomoea cairica* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 95, 421-427.
- Zang, Z., Chou, S., Tian, J., Lang, Y., Shen, Y., Ran, X., Gao, N., & Li, B. (2021). Effect of whey protein isolate on the stability and antioxidant capacity of blueberry anthocyanins: A mechanistic and in vitro simulation study. *Food Chemistry*, 336, 127700.
- Zang, Z., Chou, S., Si, X., Cui, H., Tan, H., Ding, Y., Liu, Z., Wang, H., Lang, Y., Tang, S., & others. (2022). Effect of bovine serum albumin on the stability and antioxidant activity of blueberry anthocyanins during processing and in vitro simulated digestion. *Food Chemistry*, 373(Pt B), 131496.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103-141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zhang, Y., Vareed, S. K., & Nair, M. G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*, 76(13), 1465-1472. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.025>
- Zhang, H., Xu, Z., Zhao, H., Wang, X., Pang, J., Li, Q., Yang, Y., & Ling, W. (2020). Anthocyanin supplementation improves anti-oxidative and anti-inflammatory capacity in a dose-response

manner in subjects with dyslipidemia. *Redox Biology*, 32, 101474. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101474>

– Zhao, X., Sheng, F., Zheng, J., & Liu, R. (2011). Composition and stability of anthocyanins from purple *Solanum tuberosum* and their protective influence on Cr(VI) targeted to bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7902-7909.

– Zhao, C. L., Chen, Z. J., Bai, X. S., Ding, C., Long, T. J., Wei, F. G., & Miao, K. R. (2014). Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Molecular Diversity*, 18(4), 687-700.

– Zhao, C. L., Yu, Y. Q., Chen, Z. J., Wen, G. S., Wei, F. G., Zheng, Q., Wang, C. D., & Xiao, X. L. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214, 119-128.

– Zhao, X., Ding, B.-W., Qin, J.-W., He, F., & Duan, C.-Q. (2020). Intermolecular copigmentation between five common 3-O-monoglucosidic anthocyanins and three phenolics in red wine model solutions: The influence of substituent pattern of anthocyanin B ring. *Food Chemistry*, 326, 126960.

– Zhao, X., Shen, Y., Yan, M., & Yuan, Z. (2022). Flavonoid profiles in peels and arils of pomegranate cultivars. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16, 880-890. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01216-x>

– Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 502-509.

– Zhong, H., Xu, J., Yang, M., Hussain, M., Liu, X., Feng, F., & Guan, R. (2023). Protective effect of anthocyanins against neurodegenerative diseases through the microbial-intestinal-brain axis: A critical review. *Nutrients*, 15(2), 496.

– Zhou, A., Wu, Z., Hui, A., Wang, B., Duan, X., Wang, H., & Pan, J. (2015). 3D-QSAR and molecular docking studies of flavonoid derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*, 12(9), 837-843.

– Zhu, F., Cai, Y. Z., Yang, X., Ke, J., & Corke, H. (2010). Anthocyanins, hydroxycinnamic acid derivatives, and antioxidant activity in roots of different Chinese purple-fleshed sweetpotato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7588-7596.

– Ziadlou, R., Barbero, A., Stoddart, M. J., Wirth, M., Li, Z., Martin, I., Wang, X. L., Qin, L., Alini, M., & Grad, S. (2019). Regulation of inflammatory response in human osteoarthritic chondrocytes by novel herbal small molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5745. <https://doi.org/10.3390/ijms20225745>

**Anexo A. Estructuras de los confómeros de todas las
antocianidinas en estudio**

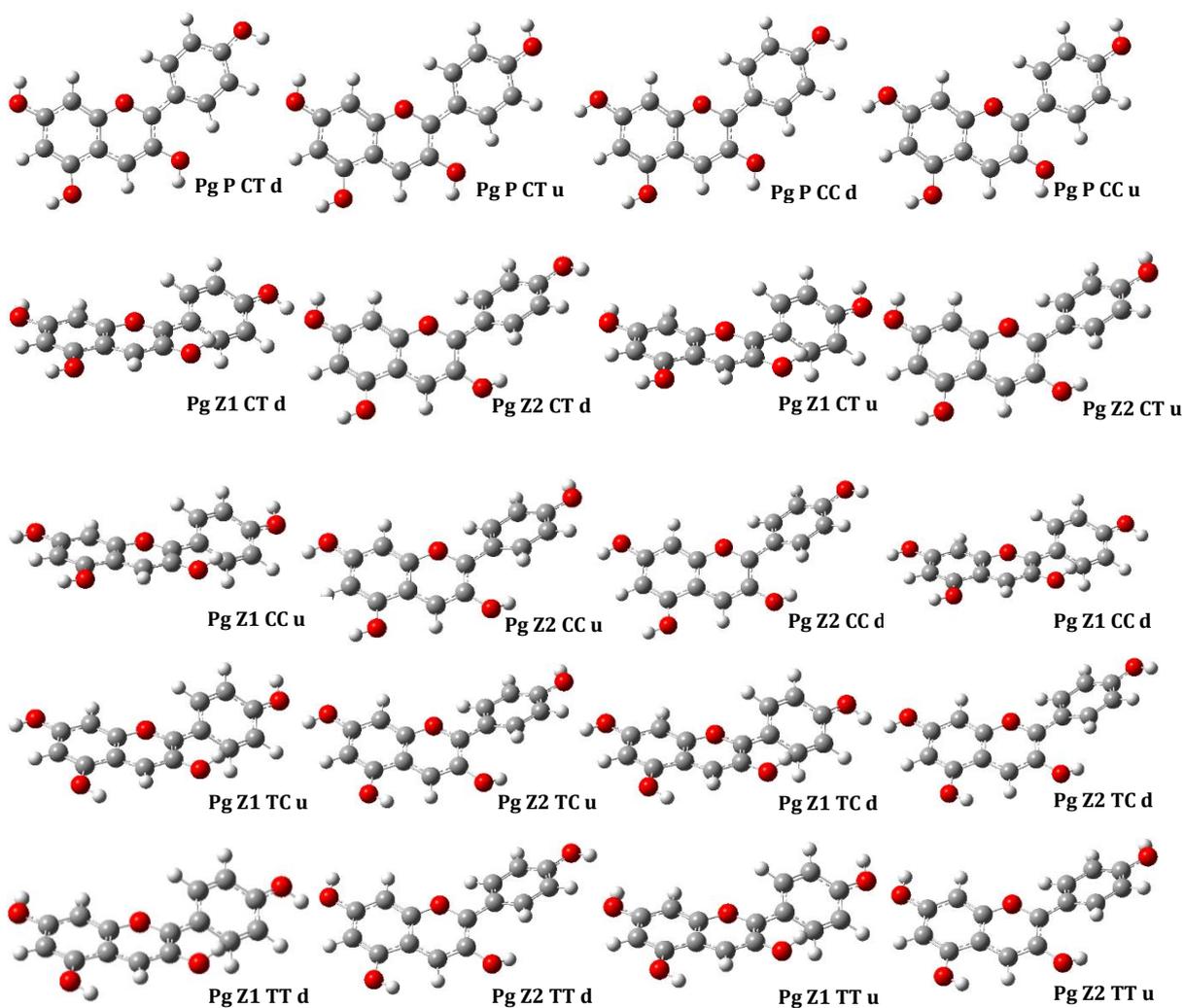
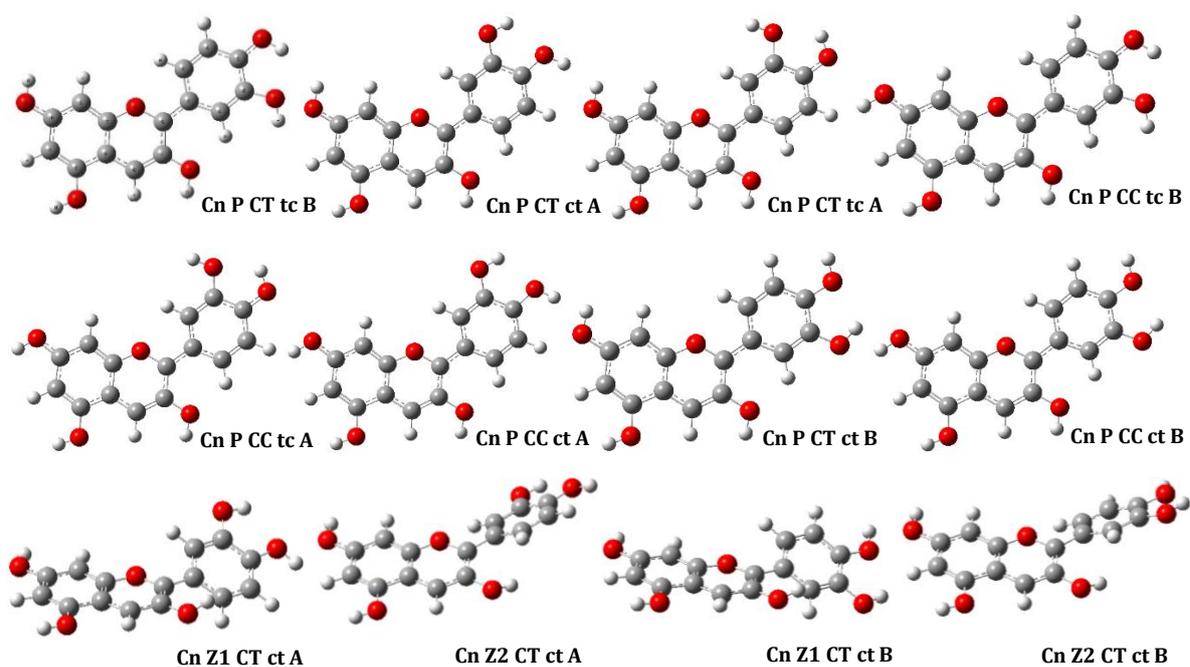
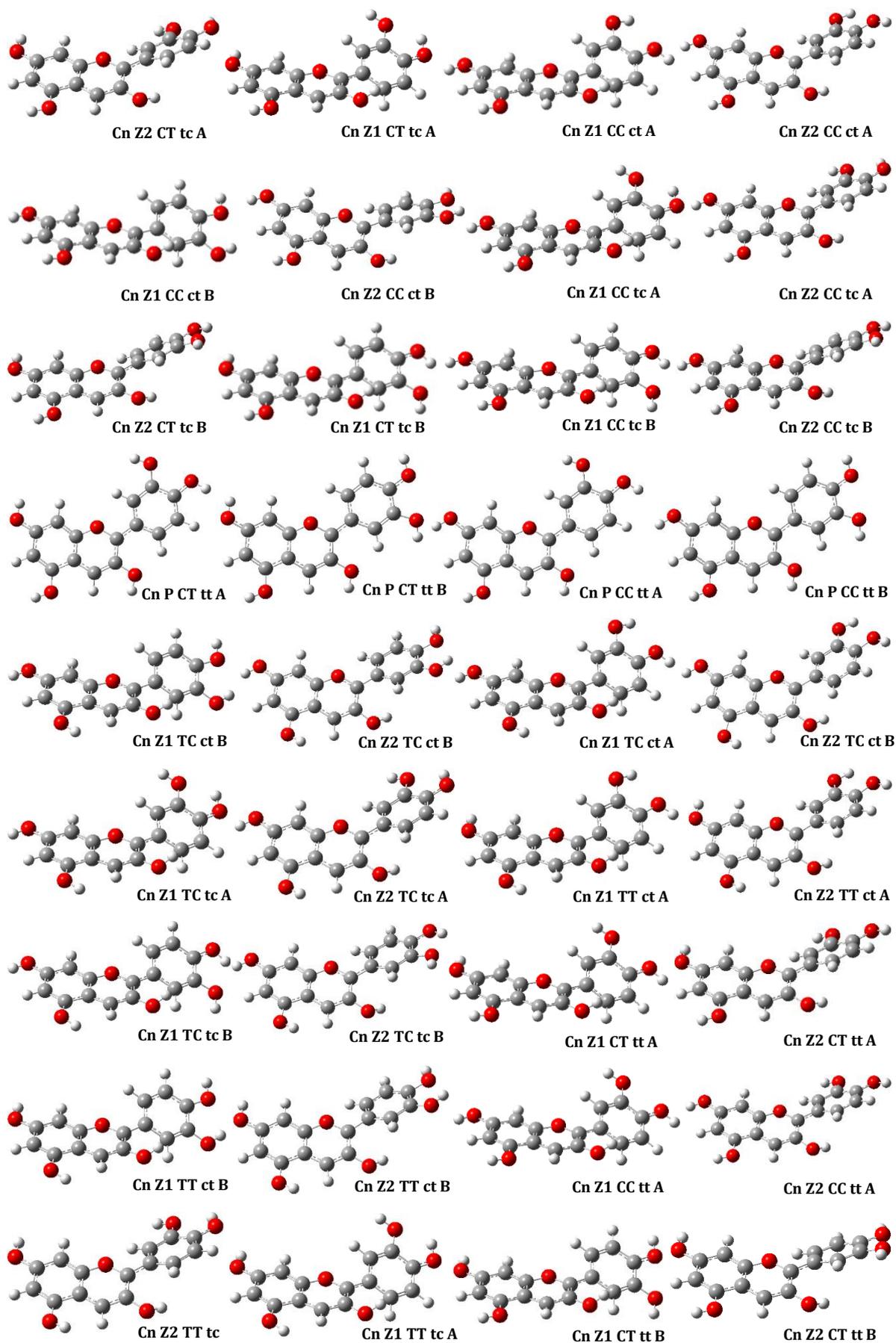


Figura A1. Estructuras optimizadas de los conformeros de pelargonidina a nivel B3LYP/6-311G++ (d,p).





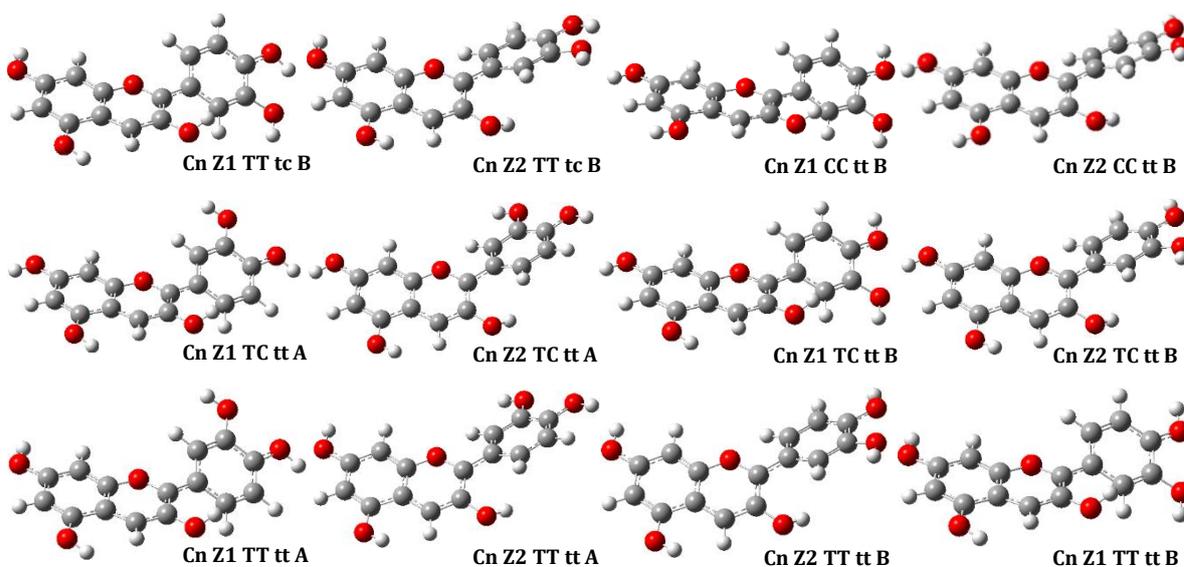
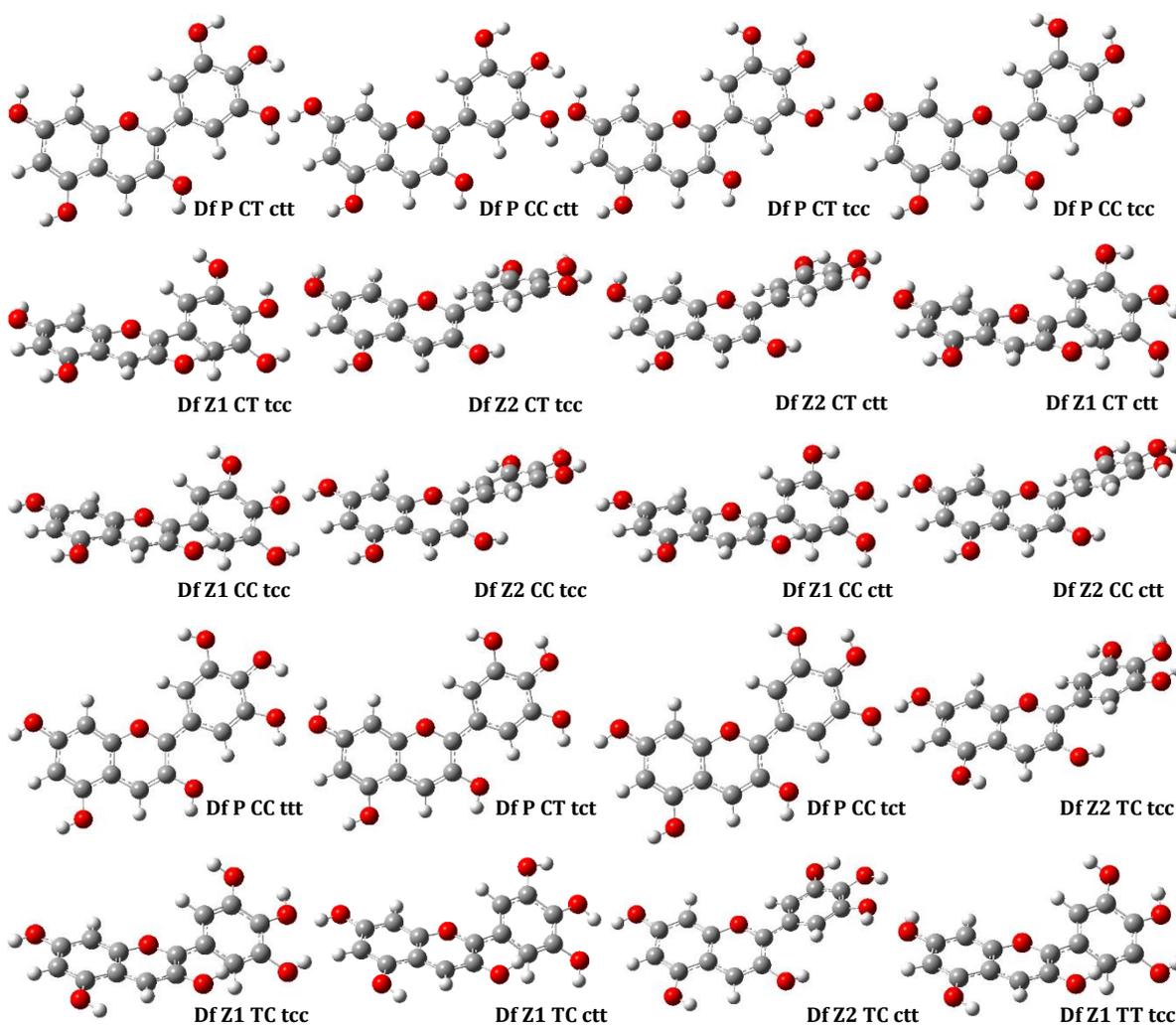


Figura A2. Estructuras optimizadas de los conformeros de cianidina a nivel B3LYP/6-311G++ (d,p).



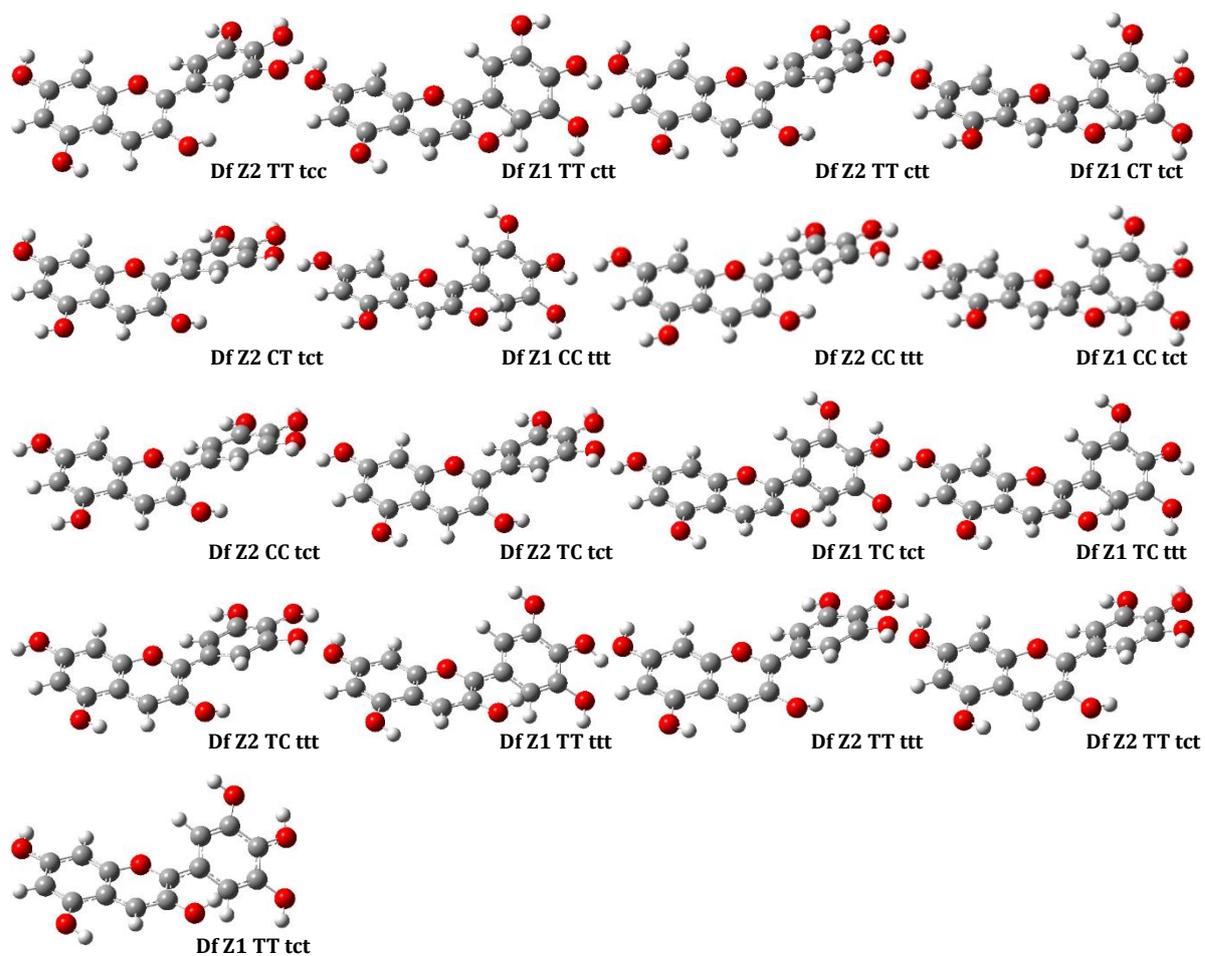
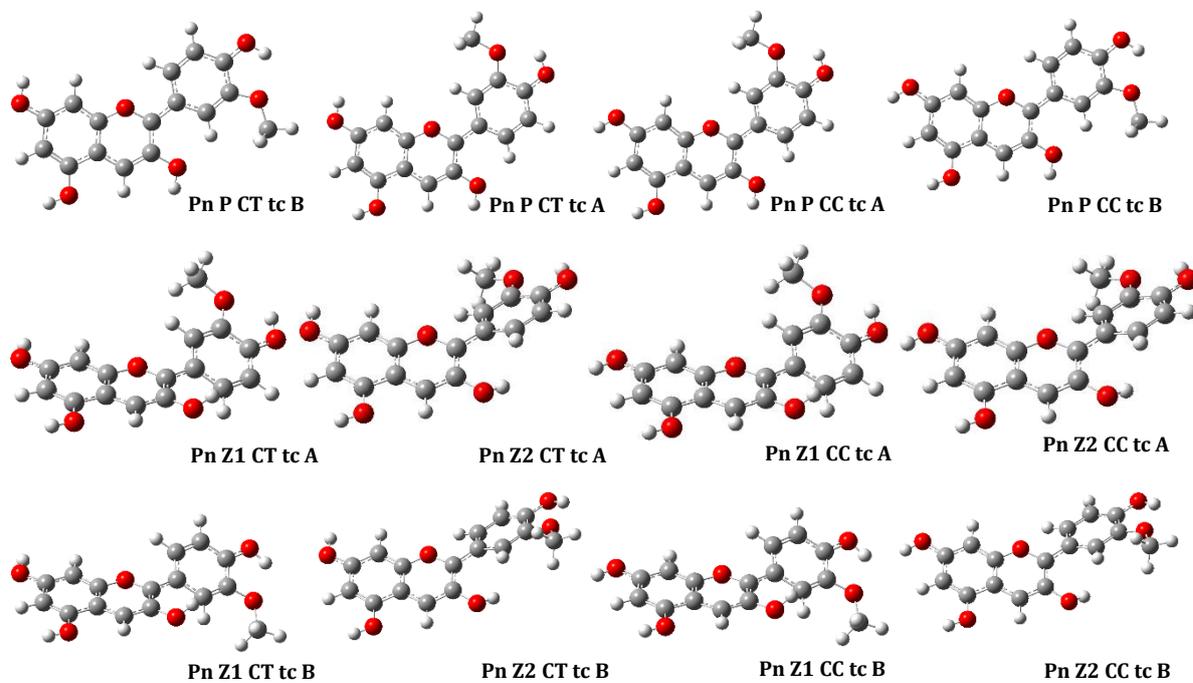


Figura A3. Estructuras optimizadas de los conformeros de delphinidina a nivel B3LYP/6-311G++ (d,p).



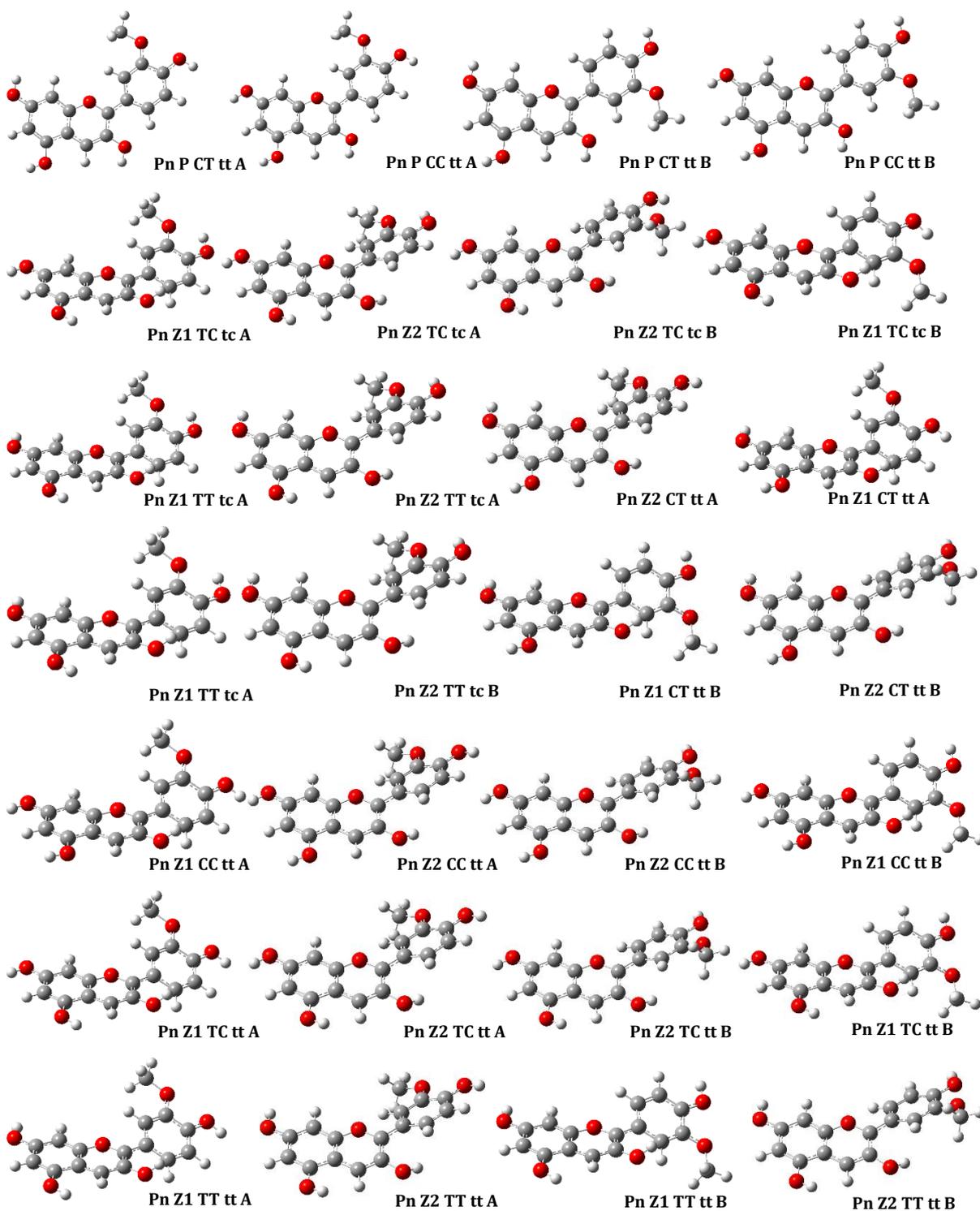
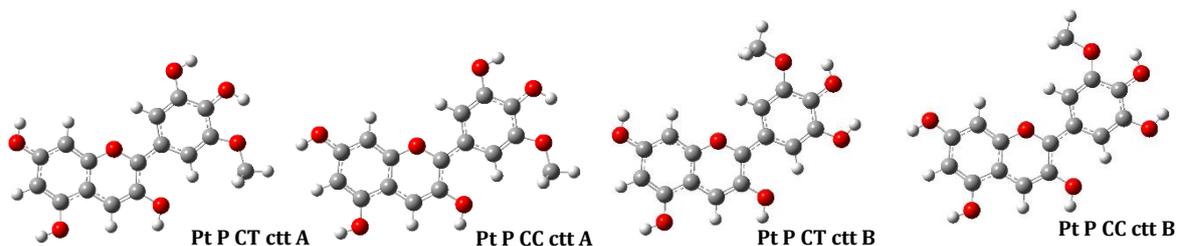
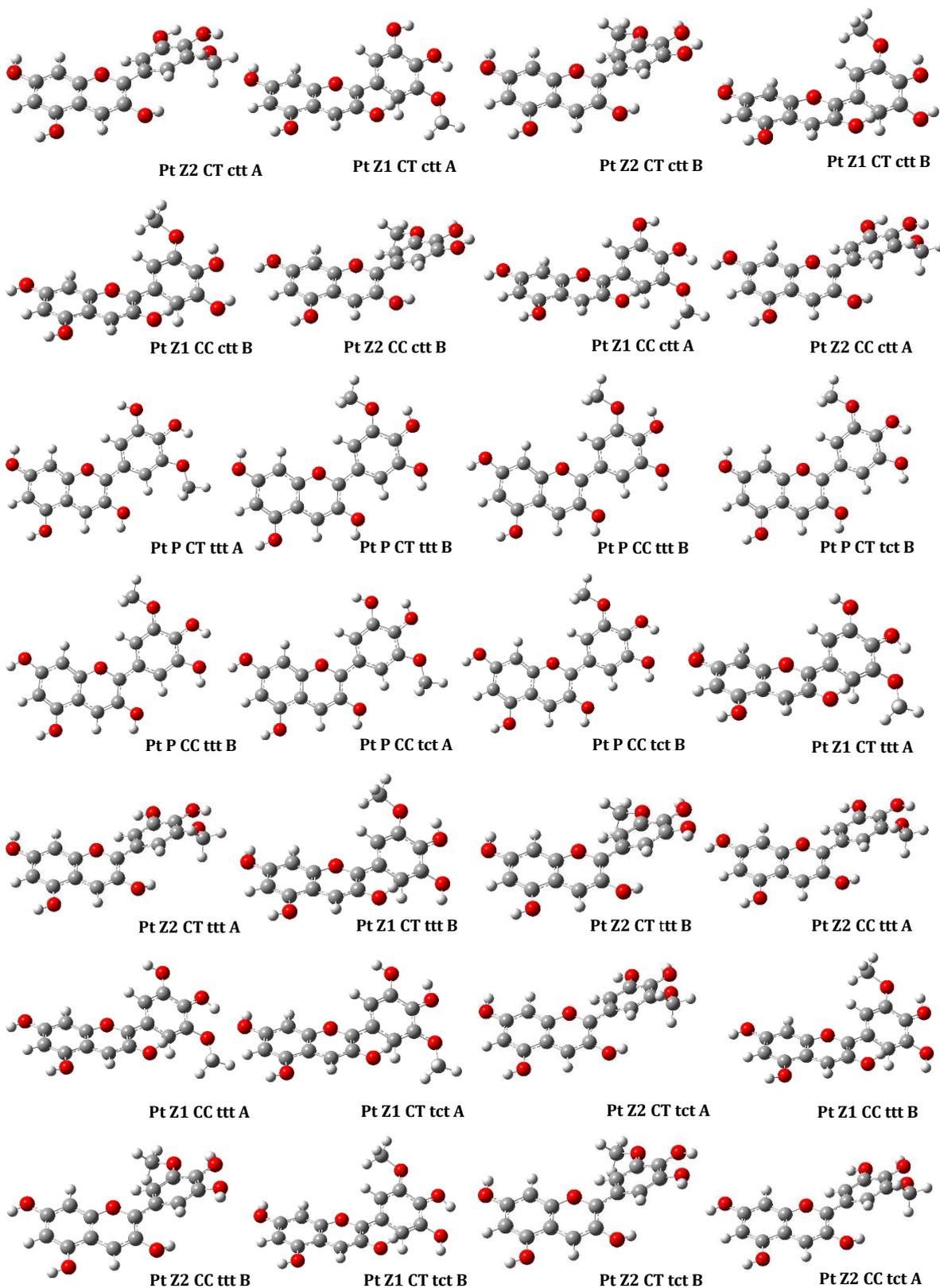


Figura A4. Estructuras optimizadas de los conformeros de peonidina a nivel B3LYP/6-311G++ (d,p).





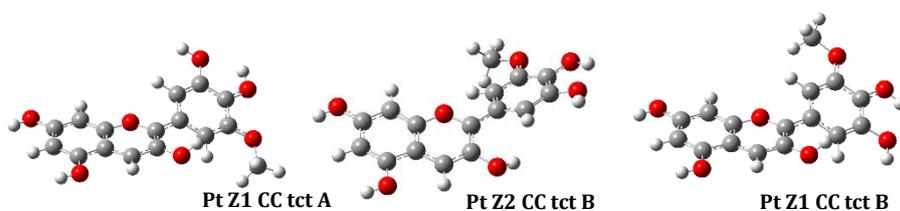


Figura A5. Estructuras optimizadas de los conformeros de petunidina a nivel B3LYP/6-311G++ (d,p).

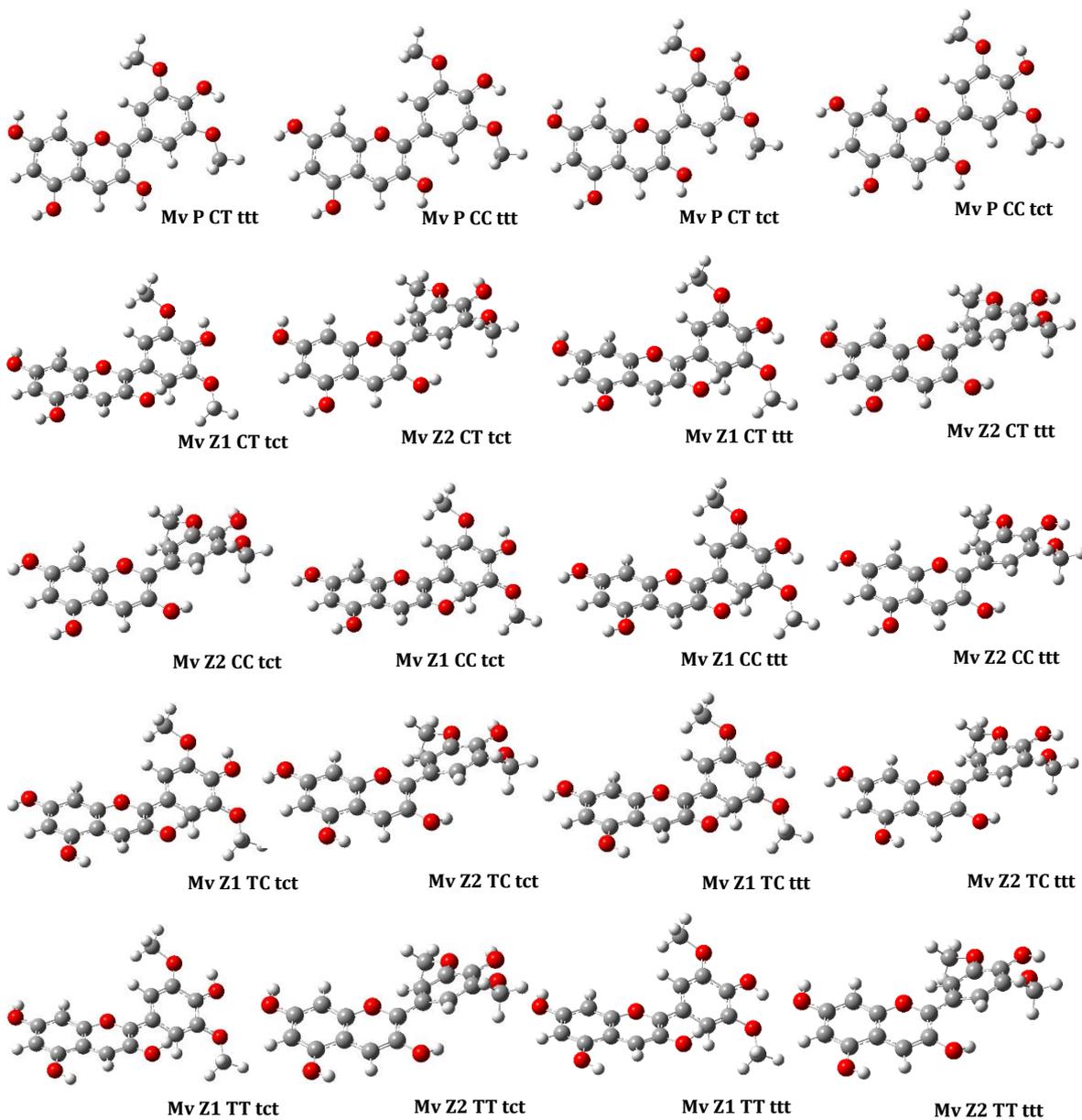


Figura A6. Estructuras optimizadas de los conformeros de malvidina a nivel B3LYP/6-311G++ (d,p).

**Anexo B. Tablas con parámetros físico-químicos de las
antocianidinas en estudio**

Espacio conformacional en vacío

A modo de ejemplo se muestran los valores de energía electrónica (E) y energía libre de Gibbs (G), junto a las diferencias respecto al conformero más estable (ΔE) y (ΔG), y las poblaciones relativas calculadas en base a estas dos energías en vacío. La similitud en los valores de energía electrónica y energía libre de Gibbs, permite utilizar el valor de energía electrónica en el resto de los cálculos. Las diferencias de energía de los diferentes conformeros en los solventes utilizados se informan en el texto.

Tabla B1. Energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al conformero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes conformeros de pelargonidina.

<i>Pelargonidina</i>	<i>E (Kcal/mol)</i>	<i>G (Kcal/mol)</i>	ΔE	ΔG	<i>Poblacion Relativa E (%)</i>	<i>Poblacion Relativa G (%)</i>
<i>Pg P CT d</i>	-598730,4449	-598758,2592	0,00	0,00	35,25	35,14
<i>Pg P CT u</i>	-598730,2296	-598758,1118	0,22	0,15	24,52	27,40
<i>Pg P CC d</i>	-598730,0696	-598757,8394	0,38	0,42	18,71	17,30
<i>Pg P CC u</i>	-598730,0069	-598757,8651	0,44	0,39	16,83	18,07
<i>Pg Z1 CT d</i>	-598728,1777	-598755,5088	2,27	2,75	0,77	0,34
<i>Pg Z2 CT d</i>	-598728,1777	-598755,5095	2,27	2,75	0,77	0,34
<i>Pg Z1 CT u</i>	-598728,1338	-598755,4612	2,31	2,80	0,71	0,31
<i>Pg Z2 CT u</i>	-598728,1338	-598755,4612	2,31	2,80	0,71	0,31
<i>Pg Z1 CC u</i>	-598727,8394	-598755,1838	2,61	3,08	0,43	0,20
<i>Pg Z2 CC u</i>	-598727,8394	-598755,1838	2,61	3,08	0,43	0,20
<i>Pg Z1 CC d</i>	-598727,8282	-598755,1838	2,62	3,08	0,43	0,20
<i>Pg Z2 CC d</i>	-598727,8282	-598755,1838	2,62	3,08	0,43	0,20
<i>Pg Z1 TC u</i>	-598724,3248	-598751,7664	6,12	6,49	0,00	0,00
<i>Pg Z2 TC u</i>	-598724,3248	-598751,7664	6,12	6,49	0,00	0,00
<i>Pg Z1 TC d</i>	-598724,289	-598751,7507	6,16	6,51	0,00	0,00
<i>Pg Z2 TC d</i>	-598724,289	-598751,7507	6,16	6,51	0,00	0,00
<i>Pg Z1 TT d</i>	-598723,7104	-598751,1834	6,73	7,08	0,00	0,00
<i>Pg Z2 TT d</i>	-598723,7104	-598751,1834	6,73	7,08	0,00	0,00
<i>Pg Z1 TT u</i>	-598723,6866	-598751,1464	6,76	7,11	0,00	0,00
<i>Pg Z2 TT u</i>	-598723,6866	-598751,1464	6,76	7,11	0,00	0,00

Tabla B2. Energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al conformero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes conformeros de cianidina.

<i>Cianidina</i>	<i>E (Kcal/mol)</i>	<i>G (Kcal/mol)</i>	ΔE	ΔG	<i>Poblacion Relativa E (%)</i>	<i>Poblacion Relativa G (%)</i>
<i>Cn P CT tc B</i>	-645946,9598	-645975,7066	0,00	0,00	21,01	19,74
<i>Cn P CT ct A</i>	-645946,9278	-645975,6570	0,03	0,05	19,90	18,15
<i>Cn P CT tc A</i>	-645946,6642	-645975,4807	0,30	0,23	12,76	13,48
<i>Cn P CC tc B</i>	-645946,5826	-645975,2849	0,38	0,42	11,12	9,69
<i>Cn P CC tc A</i>	-645946,5268	-645975,2184	0,43	0,49	10,12	8,66

<i>Cn P CC ct A</i>	-645946,4239	-645975,1274	0,54	0,58	8,50	7,43
<i>Cn P CT ct B</i>	-645946,2626	-645975,4594	0,70	0,25	6,48	13,00
<i>Cn P CC ct B</i>	-645945,9464	-645974,9159	1,01	0,79	3,80	5,20
<i>Cn Z1 CT ct A</i>	-645944,9881	-645973,0868	1,97	2,62	0,75	0,24
<i>Cn Z2 CT ct A</i>	-645944,9881	-645973,0861	1,97	2,62	0,75	0,24
<i>Cn Z1 CT ct B</i>	-645944,7917	-645972,8753	2,17	2,83	0,54	0,17
<i>Cn Z2 CT ct B</i>	-645944,7917	-645972,8747	2,17	2,83	0,54	0,17
<i>Cn Z2 CT tc A</i>	-645944,6116	-645972,8094	2,35	2,90	0,40	0,15
<i>Cn Z1 CT tc A</i>	-645944,611	-645972,8094	2,35	2,90	0,40	0,15
<i>Cn Z1 CC ct A</i>	-645944,5489	-645972,6820	2,41	3,02	0,36	0,12
<i>Cn Z2 CC ct A</i>	-645944,5489	-645972,6820	2,41	3,02	0,36	0,12
<i>Cn Z1 CC ct B</i>	-645944,4761	-645972,5829	2,48	3,12	0,32	0,10
<i>Cn Z2 CC ct B</i>	-645944,4761	-645972,5829	2,48	3,12	0,32	0,10
<i>Cn Z1 CC tc A</i>	-645944,4604	-645972,6676	2,50	3,04	0,31	0,12
<i>Cn Z2 CC tc A</i>	-645944,4598	-645972,6670	2,50	3,04	0,31	0,12
<i>Cn Z2 CT tc B</i>	-645944,4271	-645972,6550	2,53	3,05	0,29	0,11
<i>Cn Z1 CT tc B</i>	-645944,4265	-645972,6544	2,53	3,05	0,29	0,11
<i>Cn Z1 CC tc B</i>	-645944,0751	-645972,3400	2,88	3,37	0,16	0,07
<i>Cn Z2 CC tc B</i>	-645944,0751	-645972,3400	2,88	3,37	0,16	0,07
<i>Cn P CT tt A</i>	-645942,6168	-645971,4144	4,34	4,29	0,01	0,01
<i>Cn P CT tt B</i>	-645942,4605	-645971,3241	4,50	4,38	0,01	0,01
<i>Cn P CC tt A</i>	-645942,4009	-645971,0932	4,56	4,61	0,01	0,01
<i>Cn P CC tt B</i>	-645942,1474	-645970,9300	4,81	4,78	0,01	0,01
<i>Cn Z1 TC ct B</i>	-645941,026	-645969,2621	5,93	6,44	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TC ct B</i>	-645941,026	-645969,2615	5,93	6,45	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TC ct A</i>	-645941,0248	-645969,2709	5,93	6,44	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TC ct A</i>	-645941,0248	-645969,2709	5,93	6,44	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TC tc A</i>	-645941,0053	-645969,3073	5,95	6,40	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TC tc A</i>	-645941,0053	-645969,3073	5,95	6,40	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TT ct A</i>	-645940,5391	-645968,7871	6,42	6,92	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TT ct A</i>	-645940,5391	-645968,7877	6,42	6,92	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TC tc B</i>	-645940,5372	-645968,9352	6,42	6,77	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TC tc B</i>	-645940,5366	-645968,9345	6,42	6,77	0,00	0,00
<i>Cn Z1 CT tt A</i>	-645940,4764	-645968,6383	6,48	7,07	0,00	0,00
<i>Cn Z2 CT tt A</i>	-645940,4764	-645968,6358	6,48	7,07	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TT ct B</i>	-645940,4042	-645968,6478	6,56	7,06	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TT ct B</i>	-645940,4042	-645968,6478	6,56	7,06	0,00	0,00
<i>Cn Z1 CC tt A</i>	-645940,2599	-645968,4426	6,70	7,26	0,00	0,00
<i>Cn Z2 CC tt A</i>	-645940,2599	-645968,4426	6,70	7,26	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TT tc A</i>	-645940,2235	-645968,5587	6,74	7,15	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TT tc A</i>	-645940,2228	-645968,5561	6,74	7,15	0,00	0,00
<i>Cn Z1 CT tt B</i>	-645940,1927	-645968,3547	6,77	7,35	0,00	0,00
<i>Cn Z2 CT tt B</i>	-645940,1927	-645968,3547	6,77	7,35	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TT tc B</i>	-645939,9599	-645968,3578	7,00	7,35	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TT tc B</i>	-645939,9599	-645968,3578	7,00	7,35	0,00	0,00
<i>Cn Z1 CC tt B</i>	-645939,8821	-645968,0730	7,08	7,63	0,00	0,00

<i>Cn Z2 CC tt B</i>	-645939,8821	-645968,0730	7,08	7,63	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TC tt A</i>	-645936,7766	-645965,0653	10,18	10,64	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TC tt A</i>	-645936,7766	-645965,0647	10,18	10,64	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TC tt B</i>	-645936,3712	-645964,6944	10,59	11,01	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TC tt B</i>	-645936,3712	-645964,6944	10,59	11,01	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TT tt A</i>	-645936,0581	-645964,3625	10,90	11,34	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TT tt A</i>	-645936,0581	-645964,3625	10,90	11,34	0,00	0,00
<i>Cn Z2 TT tt B</i>	-645935,7506	-645964,0807	11,21	11,63	0,00	0,00
<i>Cn Z1 TT tt B</i>	-645935,7499	-645964,0820	11,21	11,62	0,00	0,00

Tabla B3. Energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al conformero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes conformeros de delfinidina.

<i>Delfinidina</i>	<i>E (Kcal/mol)</i>	<i>G (Kcal/mol)</i>	ΔE	ΔG	<i>Poblacion Relativa E (%)</i>	<i>Poblacion Relativa G (%)</i>
<i>Df P CT ctt</i>	-693163,2927	-693192,8271	0,00	0,00	48,75	47,83
<i>Df P CC ctt</i>	-693162,7876	-693192,3100	0,51	0,52	20,78	19,98
<i>Df P CT tcc</i>	-693162,5052	-693192,2585	0,79	0,57	12,90	18,32
<i>Df P CC tcc</i>	-693162,3483	-693191,9511	0,94	0,88	9,90	10,90
<i>Df Z1 CT tcc</i>	-693161,109	-693190,0585	2,18	2,77	1,22	0,45
<i>Df Z2 CT tcc</i>	-693161,1083	-693190,0579	2,18	2,77	1,22	0,45
<i>Df Z2 CT ctt</i>	-693161,0657	-693190,0378	2,23	2,79	1,14	0,43
<i>Df Z1 CT ctt</i>	-693161,0638	-693190,0340	2,23	2,79	1,13	0,43
<i>Df Z1 CC tcc</i>	-693160,9239	-693189,8922	2,37	2,93	0,89	0,34
<i>Df Z2 CC tcc</i>	-693160,9239	-693189,8922	2,37	2,93	0,89	0,34
<i>Df Z1 CC ctt</i>	-693160,6239	-693189,6431	2,67	3,18	0,54	0,22
<i>Df Z2 CC ctt</i>	-693160,6239	-693189,6431	2,67	3,18	0,54	0,22
<i>Df P CC ttt</i>	-693158,8525	-693188,4527	4,44	4,37	0,03	0,03
<i>Df P CT tct</i>	-693158,7947	-693188,4496	4,50	4,38	0,02	0,03
<i>Df P CC tct</i>	-693158,641	-693188,2042	4,65	4,62	0,02	0,02
<i>Df Z2 TC tcc</i>	-693157,5246	-693186,6405	5,77	6,19	0,00	0,00
<i>Df Z1 TC tcc</i>	-693157,524	-693186,6392	5,77	6,19	0,00	0,00
<i>Df Z1 TC ctt</i>	-693157,1067	-693186,2985	6,19	6,53	0,00	0,00
<i>Df Z2 TC ctt</i>	-693157,1067	-693186,2991	6,19	6,53	0,00	0,00
<i>Df Z1 TT tcc</i>	-693156,7716	-693185,9081	6,52	6,92	0,00	0,00
<i>Df Z2 TT tcc</i>	-693156,7716	-693185,9081	6,52	6,92	0,00	0,00
<i>Df Z1 TT ctt</i>	-693156,6223	-693185,8040	6,67	7,02	0,00	0,00
<i>Df Z2 TT ctt</i>	-693156,6223	-693185,8040	6,67	7,02	0,00	0,00
<i>Df Z1 CT tct</i>	-693156,5275	-693185,5938	6,77	7,23	0,00	0,00
<i>Df Z2 CT tct</i>	-693156,5275	-693185,5938	6,77	7,23	0,00	0,00
<i>Df Z1 CC ttt</i>	-693156,3813	-693185,5047	6,91	7,32	0,00	0,00
<i>Df Z2 CC ttt</i>	-693156,3813	-693185,5053	6,91	7,32	0,00	0,00
<i>Df Z1 CC tct</i>	-693156,355	-693185,4400	6,94	7,39	0,00	0,00
<i>Df Z2 CC tct</i>	-693156,355	-693185,4400	6,94	7,39	0,00	0,00
<i>Df Z2 TC tct</i>	-693152,9024	-693182,1381	10,39	10,69	0,00	0,00
<i>Df Z1 TC tct</i>	-693152,9018	-693182,1368	10,39	10,69	0,00	0,00
<i>Df Z1 TC ttt</i>	-693152,8384	-693182,1186	10,45	10,71	0,00	0,00

<i>Df Z2 TC ttt</i>	-693152,8384	-693182,1186	10,45	10,71	0,00	0,00
<i>Df Z1 TT ttt</i>	-693152,1833	-693181,4648	11,11	11,36	0,00	0,00
<i>Df Z2 TT ttt</i>	-693152,1833	-693181,4641	11,11	11,36	0,00	0,00
<i>Df Z2 TT tct</i>	-693152,1394	-693181,3932	11,15	11,43	0,00	0,00
<i>Df Z1 TT tct</i>	-693152,1381	-693181,3920	11,15	11,44	0,00	0,00

Tabla B4. Energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al confórmero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes confórmers de peonidina.

<i>Peonidina</i>	<i>E (Kcal/mol)</i>	<i>G (Kcal/mol)</i>	ΔE	ΔG	<i>Poblacion Relativa E (%)</i>	<i>Poblacion Relativa G (%)</i>
<i>Pn P CT tc B</i>	-670597,9678	-670628,237	0,00	0,00	31,17	37,51
<i>Pn P CT tc A</i>	-670597,831	-670628,0173	0,14	0,22	24,74	25,89
<i>Pn P CC tc A</i>	-670597,7676	-670627,8222	0,20	0,41	22,23	18,63
<i>Pn P CC tc B</i>	-670597,6051	-670627,7513	0,36	0,49	16,90	16,53
<i>Pn Z1 CT tc A</i>	-670595,7841	-670625,1778	2,18	3,06	0,78	0,21
<i>Pn Z2 CT tc A</i>	-670595,7841	-670625,1785	2,18	3,06	0,78	0,21
<i>Pn Z1 CC tc A</i>	-670595,683	-670625,0938	2,28	3,14	0,66	0,19
<i>Pn Z2 CC tc A</i>	-670595,683	-670625,0938	2,28	3,14	0,66	0,19
<i>Pn Z1 CT tc B</i>	-670595,6805	-670625,1069	2,29	3,13	0,66	0,19
<i>Pn Z2 CT tc B</i>	-670595,6805	-670625,1069	2,29	3,13	0,66	0,19
<i>Pn Z1 CC tc B</i>	-670595,321	-670624,7894	2,65	3,45	0,36	0,11
<i>Pn Z2 CC tc B</i>	-670595,321	-670624,7894	2,65	3,45	0,36	0,11
<i>Pn P CT tt A</i>	-670593,4353	-670623,6204	4,53	4,62	0,01	0,02
<i>Pn P CC tt A</i>	-670593,2734	-670623,3405	4,69	4,90	0,01	0,01
<i>Pn P CC tt B</i>	-670592,7871	-670623,1912	5,18	5,05	0,00	0,01
<i>Pn Z1 TC tc A</i>	-670592,2719	-670621,7906	5,70	6,45	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TC tc A</i>	-670592,2719	-670621,7906	5,70	6,45	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TC tc B</i>	-670591,8345	-670621,4341	6,13	6,80	0,00	0,00
<i>Pn Z1 TC tc B</i>	-670591,8339	-670621,4310	6,13	6,81	0,00	0,00
<i>Pn Z1 TT tc A</i>	-670591,4994	-670621,0407	6,47	7,20	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TT tc A</i>	-670591,4994	-670621,0407	6,47	7,20	0,00	0,00
<i>Pn Z2 CT tt A</i>	-670591,3061	-670620,7847	6,66	7,45	0,00	0,00
<i>Pn Z1 CT tt A</i>	-670591,2999	-670620,6855	6,67	7,55	0,00	0,00
<i>Pn Z1 TT tc B</i>	-670591,2635	-670620,8574	6,70	7,38	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TT tc B</i>	-670591,2635	-670620,8474	6,70	7,39	0,00	0,00
<i>Pn Z1 CT tt B</i>	-670591,1549	-670620,5318	6,81	7,71	0,00	0,00
<i>Pn Z2 CT tt B</i>	-670591,1549	-670620,5324	6,81	7,70	0,00	0,00
<i>Pn Z1 CC tt A</i>	-670591,1129	-670620,5192	6,85	7,72	0,00	0,00
<i>Pn Z2 CC tt A</i>	-670591,1129	-670620,5192	6,85	7,72	0,00	0,00
<i>Pn Z2 CC tt B</i>	-670591,1129	-670620,5192	6,85	7,72	0,00	0,00
<i>Pn Z1 CC tt B</i>	-670590,8481	-670620,2682	7,12	7,97	0,00	0,00
<i>Pn Z1 TC tt A</i>	-670587,6641	-670617,1752	10,30	11,06	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TC tt A</i>	-670587,6572	-670617,1614	10,31	11,08	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TC tt B</i>	-670587,3911	-670616,9405	10,58	11,30	0,00	0,00
<i>Pn Z1 TC tt B</i>	-670587,3905	-670616,9393	10,58	11,30	0,00	0,00

<i>Pn Z1 TT tt A</i>	-670586,9776	-670616,5088	10,99	11,73	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TT tt A</i>	-670586,977	-670616,5076	10,99	11,73	0,00	0,00
<i>Pn Z1 TT tt B</i>	-670586,7674	-670616,3118	11,20	11,93	0,00	0,00
<i>Pn Z2 TT tt B</i>	-670586,7667	-670616,3099	11,20	11,93	0,00	0,00

Tabla B5. Energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al conformero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes conformeros de petunidina.

<i>Petunidina</i>	<i>E (Kcal/mol)</i>	<i>G (Kcal/mol)</i>	ΔE	ΔG	<i>Poblacion Relativa E (%)</i>	<i>Poblacion Relativa G (%)</i>
<i>Pt P CT ctt A</i>	-717814,1225	-717845,0242	0,00	0,00	41,40	41,51
<i>Pt P CC ctt A</i>	-717813,7027	-717844,5818	0,42	0,44	20,38	20,42
<i>Pt P CT ctt B</i>	-717813,485	-717844,6985	0,64	0,33	14,11	14,14
<i>Pt P CC ctt B</i>	-717813,4799	-717844,4764	0,64	0,55	13,99	14,02
<i>Pt Z2 CT ctt A</i>	-717812,2168	-717842,4301	1,91	2,59	1,66	1,69
<i>Pt Z1 CT ctt A</i>	-717812,2161	-717842,4295	1,91	2,59	1,66	1,69
<i>Pt Z2 CT ctt B</i>	-717812,122	-717842,309	2,00	2,72	1,41	1,41
<i>Pt Z1 CT ctt B</i>	-717812,1214	-717842,3096	2,00	2,71	1,41	1,41
<i>Pt Z1 CC ctt B</i>	-717811,977	-717842,1816	2,15	2,84	1,11	1,09
<i>Pt Z2 CC ctt B</i>	-717811,977	-717842,1816	2,15	2,84	1,11	1,09
<i>Pt Z1 CC ctt A</i>	-717811,765	-717842,0216	2,36	3,00	0,77	0,78
<i>Pt Z2 CC ctt A</i>	-717811,765	-717842,0222	2,36	3,00	0,77	0,78
<i>Pt P CT ttt A</i>	-717809,991	-717841,0257	4,13	4,00	0,04	0,04
<i>Pt P CT ttt B</i>	-717809,8328	-717840,7923	4,29	4,23	0,03	0,03
<i>Pt P CC ttt A</i>	-717809,7739	-717840,7138	4,35	4,31	0,03	0,03
<i>Pt P CT tct B</i>	-717809,7657	-717840,7000	4,36	4,32	0,03	0,03
<i>Pt P CC ttt B</i>	-717809,7444	-717840,604	4,38	4,42	0,03	0,03
<i>Pt P CC tct B</i>	-717809,5925	-717840,4566	4,53	4,57	0,02	0,01
<i>Pt P CT tct A</i>	-717809,4363	-717840,5858	4,69	4,44	0,02	0,02
<i>Pt P CC tct A</i>	-717809,2938	-717840,3009	4,83	4,72	0,01	0,01
<i>Pt Z1 CT ttt A</i>	-717807,7658	-717838,0758	6,36	6,95	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CT ttt A</i>	-717807,7652	-717838,0695	6,36	6,95	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CT ttt B</i>	-717807,5556	-717837,8436	6,57	7,18	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CT ttt B</i>	-717807,5556	-717837,8442	6,57	7,18	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CC ttt A</i>	-717807,5393	-717837,8875	6,58	7,14	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CC ttt A</i>	-717807,5387	-717837,8882	6,58	7,14	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CT tct A</i>	-717807,454	-717837,7708	6,67	7,25	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CT tct A</i>	-717807,454	-717837,7708	6,67	7,25	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CC ttt B</i>	-717807,432	-717837,7457	6,69	7,28	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CC ttt B</i>	-717807,432	-717837,7457	6,69	7,28	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CT tct B</i>	-717807,3316	-717837,6961	6,79	7,33	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CT tct B</i>	-717807,3316	-717837,6961	6,79	7,33	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CC tct A</i>	-717807,2839	-717837,6284	6,84	7,40	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CC tct A</i>	-717807,2833	-717837,6278	6,84	7,40	0,00	0,00
<i>Pt Z2 CC tct B</i>	-717807,1471	-717837,5468	6,98	7,48	0,00	0,00
<i>Pt Z1 CC tct B</i>	-717807,1446	-717837,5418	6,98	7,48	0,00	0,00

Tabla B6. Energía electrónica (ΔE) y energía libre de Gibbs (ΔG) en relación al conformero más estable, junto con las poblaciones relativas calculadas a nivel B3LYP/6-311G++(d,p), corregidas por la energía del punto cero (ZPE), para los diferentes conformeros de malvidina.

Malvidina	E (Kcal/mol)	G (Kcal/mol)	ΔE	ΔG	Poblacion Relativa E (%)	Poblacion Relativa G (%)
Mv P CT ttt	-742460,5886	-742492,7378	0,00	0,00	32,70	35,41
Mv P CC ttt	-742460,4148	-742492,4849	0,17	0,25	24,38	23,10
Mv P CT tct	-742460,2968	-742492,4786	0,29	0,26	19,98	22,86
Mv P CC tct	-742460,2083	-742492,2847	0,38	0,45	17,21	16,48
Mv Z1 CT tct	-742458,403	-742489,9065	2,19	2,83	0,82	0,30
Mv Z2 CT tct	-742458,403	-742489,9071	2,19	2,83	0,82	0,30
Mv Z1 CT ttt	-742458,3967	-742489,9190	2,19	2,82	0,81	0,30
Mv Z2 CT ttt	-742458,3961	-742489,9184	2,19	2,82	0,81	0,30
Mv Z2 CC tct	-742458,2706	-742489,7879	2,32	2,95	0,65	0,24
Mv Z1 CC tct	-742458,27	-742489,7872	2,32	2,95	0,65	0,24
Mv Z1 CC ttt	-742458,1972	-742489,7452	2,39	2,99	0,58	0,23
Mv Z2 CC ttt	-742458,1972	-742489,7452	2,39	2,99	0,58	0,23
Mv Z1 TC tct	-742454,9228	-742486,5926	5,67	6,15	0,00	0,00
Mv Z2 TC tct	-742454,9228	-742486,5907	5,67	6,15	0,00	0,00
Mv Z1 TC ttt	-742454,808	-742486,5167	5,78	6,22	0,00	0,00
Mv Z2 TC ttt	-742454,803	-742486,5123	5,79	6,23	0,00	0,00
Mv Z1 TT tct	-742454,1673	-742485,8559	6,42	6,88	0,00	0,00
Mv Z2 TT tct	-742454,1673	-742485,8559	6,42	6,88	0,00	0,00
Mv Z1 TT ttt	-742454,1303	-742485,8471	6,46	6,89	0,00	0,00
Mv Z2 TT ttt	-742454,1303	-742485,8471	6,46	6,89	0,00	0,00

Momento dipolar aparente (μ^*) y polarizabilidad molecular ($\langle\alpha\rangle$) en agua

Se muestra a modo de ejemplo los valores de momento dipolar aparente (μ^*) y polarizabilidad molecular ($\langle\alpha\rangle$) para los conformeros de las seis antocianidinas obtenidos en agua, debido a su similitud con un entorno fisiológico.

Tabla B7. Valores de momento dipolar aparente (μ^*) y polarizabilidad molecular ($\langle\alpha\rangle$) para cada conformero de pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina en agua.

Agua	Momento dipolar aparente (μ^*)				Polarizabilidad molecular			
	x	y	z	Tot (Debye)	α_{xx}	α_{yy}	α_{zz}	$\langle\alpha\rangle$
PELARGONIDINA								
Pg P CC d	-5,862	4,468	-0,006	7,371	651,57	304,25	123,76	359,86
Pg P CC u	-6,826	1,185	-0,123	6,930	649,99	306,11	124,28	360,12
Pg P CT d	-2,708	2,701	0,031	3,825	646,70	306,52	123,92	359,05
Pg P CT u	-3,765	-0,837	-0,132	3,859	643,59	308,21	124,39	358,73

<i>Pg Z1 CC d</i>	-4,080	2,072	0,158	4,579	606,86	294,81	135,07	345,58
<i>Pg Z2 CC d</i>	-4,080	2,072	-0,158	4,579	606,88	294,82	135,07	345,59
<i>Pg Z1 CC u</i>	-4,913	-1,128	-1,461	5,249	605,58	296,21	134,98	345,59
<i>Pg Z2 CC u</i>	-4,913	-1,128	1,461	5,249	605,59	296,21	134,97	345,59
<i>Pg Z1 CT d</i>	-1,044	-0,014	0,217	1,067	600,29	296,86	135,28	344,14
<i>Pg Z2 CT d</i>	-1,043	-0,013	-0,218	1,066	600,10	296,91	135,25	344,09
<i>Pg Z1 CT u</i>	-1,869	-3,200	-1,408	3,964	598,86	298,28	135,15	344,10
<i>Pg Z2 CT u</i>	-1,868	-3,201	1,408	3,964	598,87	298,25	135,17	344,10
CIANIDINA								
<i>Cn P CC ct A</i>	-5,493	5,785	-0,123	7,978	665,34	319,96	126,60	370,63
<i>Cn P CC tc A</i>	-9,635	0,726	0,000	9,663	675,63	320,67	126,41	374,24
<i>Cn P CT ct A</i>	-2,306	3,973	-0,226	4,599	658,63	322,05	126,86	369,18
<i>Cn P CT tc A</i>	-6,436	-1,074	0,000	6,525	669,30	322,83	126,45	372,86
<i>Cn Z1 CC ct A</i>	-3,707	3,098	0,826	4,901	611,06	309,99	139,27	353,44
<i>Cn Z2 CC ct A</i>	-3,707	3,098	-0,826	4,901	611,09	309,99	139,27	353,45
<i>Cn Z1 CC tc A</i>	-7,559	-1,600	-1,606	7,891	626,93	312,01	137,76	358,90
<i>Cn Z2 CC tc A</i>	-7,559	-1,600	1,606	7,891	626,93	312,01	137,76	358,90
<i>Cn Z1 CT ct A</i>	-0,537	1,220	1,039	1,690	603,97	312,14	139,51	351,88
<i>Cn Z2 CT ct A</i>	-0,537	1,220	-1,039	1,690	603,97	312,14	139,51	351,88
<i>Cn Z1 CT tc A</i>	-4,388	-3,457	-1,437	5,768	619,69	314,11	138,00	357,27
<i>Cn Z2 CT tc A</i>	-4,388	-3,457	1,437	5,768	619,69	314,11	138,00	357,27
<i>Cn P CC ct B</i>	-7,311	-0,412	0,000	7,322	660,68	316,63	126,44	367,92
<i>Cn P CC tc B</i>	-8,917	6,459	-0,172	11,012	689,84	315,20	127,27	377,44
<i>Cn P CT ct B</i>	-4,355	-2,586	0,000	5,065	654,44	318,67	126,47	366,53
<i>Cn P CT tc B</i>	-5,279	3,945	0,223	6,593	667,52	317,45	127,32	370,76
<i>Cn Z1 CC ct B</i>	-5,300	-2,665	-1,971	6,251	613,63	302,31	141,13	352,35
<i>Cn Z2 CC ct B</i>	-5,300	-2,665	1,971	6,251	613,63	302,31	141,13	352,35
<i>Cn Z1 CC tc B</i>	-6,663	3,313	0,452	7,455	626,49	302,50	140,64	356,54
<i>Cn Z2 CC tc B</i>	-6,663	3,313	-0,452	7,455	626,49	302,50	140,64	356,54
<i>Cn Z1 CT ct B</i>	-2,343	-4,885	-1,887	5,737	607,54	304,59	140,97	351,03
<i>Cn Z2 CT ct B</i>	-2,343	-4,885	1,887	5,737	607,54	304,59	140,97	351,03
<i>Cn Z1 CT tc B</i>	-3,707	1,101	0,466	3,895	620,49	304,81	140,44	355,25
<i>Cn Z2 CT tc B</i>	-3,707	1,101	-0,466	3,895	620,49	304,81	140,44	355,25
DELFINIDINA								
<i>Df P CC ctt</i>	-7,951	7,020	-0,187	10,608	683,74	329,92	129,31	380,99
<i>Df P CC tcc</i>	-10,061	-0,641	0,000	10,081	682,48	330,56	128,97	380,67
<i>Df P CT ctt</i>	-4,860	5,030	-0,215	6,998	676,99	332,08	129,37	379,48
<i>Df P CT tcc</i>	-6,964	-2,618	0,000	7,440	675,75	332,71	129,00	379,15
<i>Df Z1 CC ctt</i>	-6,291	4,217	0,906	7,628	627,91	316,61	145,03	363,18
<i>Df Z2 CC ctt</i>	-6,291	4,217	-0,906	7,628	627,91	316,61	145,03	363,18
<i>Df Z1 CC tcc</i>	-7,923	-2,979	-1,979	8,693	629,10	317,03	144,40	363,51
<i>Df Z2 CC tcc</i>	-7,923	-2,979	1,979	8,693	629,10	317,03	144,40	363,51
<i>Df Z1 CT ctt</i>	-3,217	2,192	1,178	4,067	620,70	318,57	145,11	361,46
<i>Df Z2 CT ctt</i>	-3,217	2,192	-1,178	4,067	620,70	318,57	145,11	361,46
<i>Df Z1 CT tcc</i>	-4,848	-4,995	-1,698	7,165	622,28	319,20	144,47	361,98
<i>Df Z2 CT tcc</i>	-4,848	-4,995	1,698	7,165	622,28	319,20	144,47	361,98

PEONIDINA								
<i>Pn P CC tc A</i>	-9,91	0,09	-0,20	9,91	692,16	348,58	140,67	393,80
<i>Pn P CT tc A</i>	-6,58	-1,45	-0,17	6,74	685,60	350,56	140,76	392,30
<i>Pn Z1 CC tc A</i>	-7,76	-2,17	-1,62	8,22	641,61	338,62	153,58	377,94
<i>Pn Z2 CC tc A</i>	-7,76	-2,17	1,62	8,22	641,62	338,62	153,57	377,94
<i>Pn Z1 CT tc A</i>	-4,48	-3,75	-1,24	5,98	633,02	339,91	154,56	375,83
<i>Pn Z2 CT tc A</i>	-4,48	-3,75	1,24	5,98	633,00	339,90	154,56	375,82
<i>Pn P CC tc B</i>	-8,23	6,53	-0,15	10,50	694,41	338,32	142,23	391,66
<i>Pn P CT tc B</i>	-5,43	4,16	-0,23	6,84	688,37	340,32	142,15	390,28
<i>Pn Z1 CC tc B</i>	-6,79	3,64	0,28	7,71	652,13	324,98	155,06	377,39
<i>Pn Z2 CC tc B</i>	-6,79	3,64	-0,28	7,71	652,13	324,99	155,04	377,39
<i>Pn Z1 CT tc B</i>	-4,00	1,25	0,46	4,21	645,00	326,56	155,54	375,70
<i>Pn Z2 CT tc B</i>	-3,99	1,25	-0,46	4,21	645,00	326,56	155,53	375,70
PETUNIDINA								
<i>Pt P CC ctt A</i>	-7,72	7,46	0,04	10,73	710,78	351,75	143,17	401,90
<i>Pt P CT ctt A</i>	-4,79	5,24	0,10	7,10	704,24	353,76	143,21	400,40
<i>Pt Z1 CC ctt A</i>	-6,34	4,56	0,74	7,84	653,31	335,82	161,12	383,42
<i>Pt Z2 CC ctt A</i>	-6,34	4,56	-0,74	7,84	653,30	335,82	161,12	383,41
<i>Pt Z1 CT ctt A</i>	-3,41	2,36	1,12	4,30	645,77	337,47	161,70	381,64
<i>Pt Z2 CT ctt A</i>	-3,41	2,36	-1,12	4,30	645,79	337,47	161,70	381,65
<i>Pt P CC ctt B</i>	-10,20	-1,14	0,00	10,26	703,65	355,98	142,93	400,85
<i>Pt P CT ctt B</i>	-6,99	-2,94	0,00	7,58	696,92	358,04	142,91	399,29
<i>Pt Z1 CC ctt B</i>	-7,99	-3,55	-1,77	8,92	649,64	342,70	159,63	383,99
<i>Pt Z2 CC ctt B</i>	-7,99	-3,55	1,77	8,92	649,69	342,54	159,65	383,96
<i>Pt Z1 CT ctt B</i>	-4,79	-5,35	-1,32	7,31	643,60	345,15	159,32	382,69
<i>Pt Z2 CT ctt B</i>	-4,79	-5,36	1,32	7,31	644,31	345,05	159,44	382,93
MALVIDINA								
<i>Mv P CC tct</i>	-12,59	2,24	0,00	12,79	745,15	378,55	157,00	426,90
<i>Mv P CC ttt</i>	-11,35	6,18	0,00	12,92	748,07	377,07	157,01	427,38
<i>Mv P CT tct</i>	-9,55	0,19	0,00	9,56	738,36	380,63	157,05	425,35
<i>Mv P CT ttt</i>	-8,32	4,12	0,00	9,28	741,30	379,13	157,05	425,83
<i>Mv Z1 CC tct</i>	-10,78	-0,58	-1,26	10,87	692,76	362,65	175,63	410,35
<i>Mv Z2 CC tct</i>	-10,78	-0,58	1,26	10,87	692,76	362,65	175,63	410,35
<i>Mv Z1 CC ttt</i>	-9,83	3,29	-0,37	10,37	695,42	362,27	174,90	410,86
<i>Mv Z2 CC ttt</i>	-9,83	3,29	0,37	10,37	695,42	362,28	174,90	410,86
<i>Mv Z1 CT tct</i>	-7,74	-2,60	-0,81	8,21	685,26	364,37	176,16	408,60
<i>Mv Z2 CT tct</i>	-7,74	-2,60	0,81	8,21	685,16	364,35	176,15	408,55
<i>Mv Z1 CT ttt</i>	-6,82	1,25	0,09	6,93	687,54	363,89	175,55	408,99
<i>Mv Z2 CT ttt</i>	-6,82	1,25	-0,09	6,93	687,53	363,89	175,55	408,99

Anexo C. Publicaciones vinculadas a esta Tesis

Capítulos 5 y 6

Szewczuk, N. A., Lobayan, R. M., Duchowicz, P. R., & Pomilio, A. B. (2022) Estudio estructural y conformacional de las antocianidinas: pelargonidina, cianidina y delphinidina. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 109(1), 102-122. <https://aqa.org.ar/index.php/publicaciones2/revistas/anales-aqa>

Szewczuk, N. A., Duchowicz, P. R., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. (2023) Resonance structure contributions, flexibility, and frontier molecular orbitals (HOMO–LUMO) of pelargonidin, cyanidin, and delphinidin throughout the conformational space: application to antioxidant and antimutagenic activities. *Journal of Molecular Modeling*, 29(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05392-5>

Szewczuk, N. A., Duchowicz, P. R., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. Conformational space analysis of methoxylated anthocyanidins in vacuum and solvents to explain antioxidant and antimutagenic activities. *Current Physical Chemistry*, in press.

Szewczuk, N. A., Duchowicz, P. R., Pomilio, A. B., & Lobayan, R. M. Positively charged quinoidal structures and antioxidant activity in anthocyanidins: DFT, AIM, and NBO analyses. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Submitted.

Capítulo 7

Duchowicz, P. R., Szewczuk, N. A. & Pomilio, A. B. (2019). QSAR studies of the antioxidant activity of anthocyanins. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5518-5530. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04024-w>

Szewczuk, N. A., Duchowicz, P. R., & Pomilio, A. B. (2020). QSAR Analysis for the Inhibition of the Mutagenic Activity by Anthocyanin Derivatives. *International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships (IJQSPR)*, 5(4), 69-82. <https://doi.org/10.4018/IJQSPR.20201001.oa1>

Szewczuk, N. A., Duchowicz, P. R., & Pomilio, A. B. QSAR study for the anticarcinogenic activity of anthocyanins and flavonoids. Submitted

Capítulo 8

Pomilio, A. B., Szewczuk, N. A., & Duchowicz, P. R. (2024). Dietary anthocyanins balance immune signs in osteoarthritis and obesity – update of human in vitro studies and clinical trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(9), 2634-2672. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2124948>

Agradecimientos

Al finalizar esta etapa tan significativa en mi vida, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a quienes me acompañaron y apoyaron en este camino.

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi directora de tesis, la Dra. Alicia Pomilio, por su constante guía, paciencia y dedicación a lo largo de todo este proceso. Su apoyo y motivación fueron clave en mi desarrollo como profesional y en la concreción de este trabajo. Al Dr. Pablo Duchowicz, mi director de tesis, por su invaluable conocimiento, su compromiso académico y su orientación precisa, que han sido fundamentales en mi formación.

Agradezco también al Dr. Arturo Vitale, por las enriquecedoras charlas que compartimos, por su paciencia y por los valiosos aprendizajes que me transmitió en este proceso. A la Dra. Rosana Lobayan, por su colaboración, su disposición constante y su apoyo, que contribuyeron significativamente a este trabajo.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres y a mi hermana, quienes siempre han estado a mi lado, brindándome su amor incondicional, su apoyo constante y enseñándome el valor del esfuerzo y la perseverancia.

A Flor, mi compañera de vida, quien nunca dejó de creer en mí, incluso en los momentos más difíciles. Gracias por tu apoyo inquebrantable y por estar siempre a mi lado.

Finalmente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la financiación de mi beca doctoral, y al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), por brindarme un espacio en el que pude desarrollar este trabajo. A la Universidad Nacional de La Plata, mi más sincero agradecimiento por haber sido el lugar donde comencé mi formación académica y científica.

A todos ellos, y a quienes de una u otra manera me han acompañado en este camino, les estaré eternamente agradecido.