



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**SILIBINA, SUS DERIVADOS Y SU INTERACCIÓN
CON CÚMULOS METÁLICOS:
UN ESTUDIO TEÓRICO**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA:
MIGUEL REINA TAPIA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. ANA MARÍA MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
BETSABEÉ MAREL MONROY PELÁEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM**

**JORGE GARZA OLGUÍN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- IZTAPALAPA**

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL, ENERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Martínez, gracias por su amistad y su cariño, por sus enseñanzas y su paciencia.

A mi comité tutor y al jurado asignado, gracias por detenerse a leer este trabajo que significa tanto para mí.

A CONACYT por la beca de maestría y por la beca mixta para la estancia de tres meses en Montpellier, Francia.

A la CEP por la ayuda otorgada para llevar a cabo la estancia en el extranjero.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales, por la ayuda económica para asistir al 17th International Carotenoids Symposium en Park City, Utah.

A supercómputo Miztli por la oportunidad de trabajar con tan poderosa herramienta.

Al PAEP por la ayuda económica para la impresión de las tesis

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las moléculas silibina, 2,3-dehidrosilibina y seis de sus derivados. Se analizaron aspectos estructurales ligados a la estabilidad, y se compararon los espectros de caracterización teóricos de UV-visible y Raman con el objetivo de poder seguir analíticamente la oxidación de silibina a 2,3-dehidrosilibina, y de diferenciar la presencia de los diferentes sustituyentes. También se analizó la capacidad antirradicálica de estos sistemas a pH fisiológico.

Se optimizaron las geometrías de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina. De cada una estas moléculas se optimizaron cinco derivados monometilados y una molécula sin grupos metoxi ($-\text{OCH}_3$). Para la silibina y la 2,3-dehidrosilibina se llevó a cabo un estudio que muestra la importancia de los puentes de hidrógeno intramoleculares.

Para estudiar la capacidad antirradicálica de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina y sus derivados se llevó a cabo un análisis sobre la abundancia relativa de las especies a $\text{pH}=7.4$ en el que se concluyó que cerca de 70% de la silibina se encuentra sin desprotonar, pero alrededor de 60% de la 2,3-dehidrosilibina se encuentra desprotonada, por lo que las propiedades antirradicálicas de estas moléculas cambian con el pH. Se construyó el mapa donador-aceptor de electrones en el que se comparó la capacidad de aceptar y donar electrones de las especies neutras, desprotonadas y doblemente desprotonadas con el objetivo de analizar si podían reaccionar con los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$. Por último, se realizó el estudio de la formación de aductos como mecanismo para estabilizar al radical libre $\bullet\text{OOH}$.

Se estudió la interacción de cúmulos metálicos formados por cuatro átomos de Cu, Ag y Au (neutros y globalmente cargados de acuerdo con los estados de oxidación más comunes). Se propone que la presencia de los metales aumenta la intensidad de las señales Raman y UV-visible. Esto se sugiere para aumentar la sensibilidad de los métodos de detección. Además, se estudió cómo la presencia de estos metales mejora la capacidad antirradicálica de la silibina.

Por último, se llevó a cabo el estudio de la interacción de cúmulos mixtos binarios y ternarios y se observó que debido a la naturaleza de los cúmulos existían cambios en los espectros de caracterización que permiten detectar silibina de una forma más sensible,

además de que estos sistemas pueden modular incrementando la capacidad antirradicálica de la silibina.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. CARDO MARIANO: UNA PLANTA MEDICINAL	1
2. FLAVONOIDES Y SILIMARINA	4
3. ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SILIBINA	6
4. COMPONENTES MAYORITARIOS DE SILIMARINA	7
5. PROPIEDADES QUÍMICAS DE SILIBINA	8
6. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA SILIBINA	11
7. INTERACCIÓN DE LA SILIBINA CON CÚMULOS METÁLICOS	12
8. BIBLIOGRAFÍA	15
9. REFERENCIAS IMÁGENES	19
OBJETIVOS	20
MARCO TEÓRICO	21
1. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD	21
2. MECANISMOS DE REACTIVIDAD	28
3. BIBLIOGRAFÍA	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
1. ESTUDIO DE SILIBINA, 2,3-DEHIDROSILIBINA Y SUS DERIVADOS METILADOS	32
2. INTERACCIÓN DE CÚMULOS DE CUATRO ÁTOMOS METÁLICOS CON SILIBINA	53
3. INTERACCIÓN DE CÚMULOS METÁLICOS DE Cu, Ag Y Au Y CON SILIBINA COMO SISTEMAS CARGADOS	75
4. INTERACCIÓN DE CÚMULOS MIXTOS BINARIOS Y TERNARIOS EN SILIBINA	88
5. BIBLIOGRAFÍA	97
CONCLUSIONES	100
APÉNDICES	101

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. CARDO MARIANO: UNA PLANTA MEDICINAL

○ TAXONOMÍA Y CATEGORÍA TAXONÓMICA DEL CARDO MARIANO

El cardo mariano o *Silybum marianum* es una planta que pertenece a la extensa familia Asteraceae, que reúne aproximadamente 23 500 especies en 1 600 géneros y se caracteriza por su inflorescencia en forma de estrella¹. De hecho, el nombre Asteraceae proviene del término aster, “ἀστήρ”, que en griego significa estrella.

El cardo mariano es una planta anual o en algunos casos bienal dependiendo de la latitud a la que se encuentre. Puede crecer entre 30 y 200 centímetros, tiene un tallo largo y hueco que desemboca en la flor compuesta, de forma cónica, de aproximadamente ocho centímetros de diámetro de color rojizo o púrpura. Las hojas de la planta son oblongas o lanceoladas, dentelladas y con extremidades filosas y espinosas de color verde pálido y con venas blancas. Generalmente florea de junio a agosto en el hemisferio norte y de diciembre a febrero en latitudes australes (Figura 1).



Figura 1. Imagen y diferentes ilustraciones del cardo mariano.

Aunque el nombre científico más común es *Silybum marianum*, existen otros como *Mariana lactea* Hill, *Carduus marianus* o *Silybum mariae*¹. Además, se conoce por su nombre común como cardo mariano, cardo blanco, cardo lechero o cardo santo, y en algunos otros idiomas como blessed milk thistle en inglés, chardon argente en francés, cardo-leiteiro en portugués o cardo di Maria en italiano por mencionar sólo algunos.

El cardo mariano se reproduce en suelos ricos en nitratos y con altos niveles de nitrógeno y temperaturas promedio anuales mayores de 10 °C. Al término de su ciclo biológico (uno o dos años) y la muerte de la planta, las semillas se depositan en el suelo y ahí se nace una nueva planta, con lo que la probabilidad de auto-perpetuarse y volverse una plaga es bastante alta. Así lo relata Charles Darwin durante su travesía de cinco años alrededor del mundo a bordo de *The Beagle*. En 1837 describe la invasión de cardo mariano de la siguiente forma: “very many (probably several hundred) square miles are covered by one mass of these prickly plants, and are impenetrable to man or beast. Over the undulating plains, where these great beds occur, nothing else can now live”.



Figura 2. Semillas de cardo mariano en una planta muerta.

Su hábitat es bastante variado pero sobre todo se encuentra en zonas cercanas a accesos fluviales donde la humedad es elevada y en zonas de llanuras y tierras de pastoreo.

Aunque originaria de la península Arábiga, el sur de Europa, algunas regiones de la India y el norte de África, el cardo mariano fue introducido como planta medicinal en América, África subsahariana, Japón y Oceanía por lo que se encuentra hoy ampliamente repartido

por el mundo (Figura 3). En México, se encuentra en los estados de México e Hidalgo y el Distrito Federal. Se le considera una planta exótica en probable expansión.

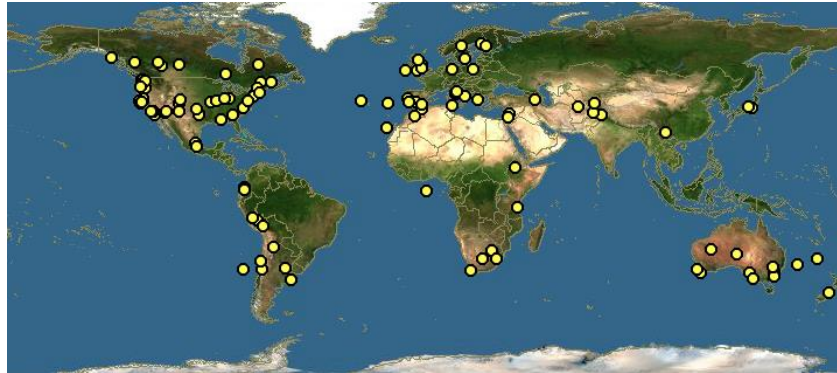


Figura 3. Distribución del cardo mariano en el mundo.

○ EL CARDO MARIANO, UNA PLANTA MEDICINAL

Se tienen referencias del cardo mariano desde la Antigüedad aunque sin hacer referencia a sus propiedades medicinales². El filósofo griego Teofrasto de Ereso (371-287 a.C.), considerado el padre de la botánica por sus obras *De historia plantarum* (Historia de las plantas) y *De causis plantarum* (Sobre las causas de las plantas) menciona el cardo mariano describiéndolo como un matorral espinoso pero sin hacer referencia alguna a sus propiedades medicinales³.

En el Renacimiento, botánicos, médicos y boticarios europeos hacen alusión a las propiedades curativas de la planta. Dos de los más importantes fueron Pietro Andrea Mattioli, que explica que las semillas molidas servían para aliviar dolores de costado, pero sobre todo Hieronimus Block, que describe textualmente en su libro *Kreutterbuch*: “Das gebrandt wasser ist gut zu der enzündten lebern”, refiriéndose probablemente a que una extracción alcohólica caliente de cardo mariano es buena para el hígado³. A partir de ese momento, el cardo mariano se menciona recurrentemente como una planta benéfica para tratar enfermedades y afecciones del hígado^{4,5}.

Actualmente, el cardo mariano es una planta de importancia terapéutica para tratamiento de problemas hepáticos^{4,5}, envenenamiento por hongos⁶; por sus potentes propiedades antiinflamatorias⁷ y aplicaciones anticancerígenas en próstata y ovarios⁸. El componente

activo del cardo mariano es la silimarina, que es una mezcla de muchas sustancias. Las propiedades antioxidantes de la silimarina se han probado *in vitro* e *in vivo*^{9,10} e incluso se conoce que protege contra la citotoxicidad inducida de la nicotina¹¹. Su extracción se lleva a cabo en enormes cantidades por la industria farmacéutica. Las semillas de la flor se muelen o se maceran y después se hacen extracciones sucesivas con disolventes orgánicos polares como metanol, etanol o acetona y luego con disolventes de polaridad media como acetato de etilo. Los lípidos e impurezas polares se remueven y la mezcla resultante se conoce como silimarina. Ésta es una mezcla compleja de sustancias llamadas flavonoides¹².

2. FLAVONOIDES Y SILIMARINA

○ FLAVONOIDES

Los flavonoides son metabolitos secundarios que a su vez son compuestos orgánicos producidos por los organismos; no tienen relevancia en el crecimiento y reproducción de los mismos, están presentes en las plantas y son responsables del color amarillo, rojo o azul de las flores³. Estos pigmentos naturales son igualmente los metabolitos secundarios más importantes en la dieta humana. Se encuentran presentes en cantidades apreciables en perejil, cebollas, moras, arándanos y otras bayas, además de encontrarse en cítricos, plátanos y en chocolate amargo¹³.

La estructura química de los flavonoides tiene dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico. Se trata de un esqueleto básico de 17 átomos que se conoce como estructuras C6-C3-C6 por la disposición de los átomos de carbono (Figura 4).

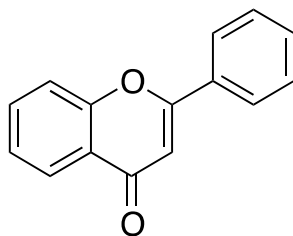


Figura 4. Esqueleto de la estructura química de la flavona.

Los flavonoides presentan todo de tipo de actividad biológica y farmacéutica de interés general para la salud humana, por lo que su estudio se ha acrecentado en los últimos 60 años. Estos compuestos presentan respuestas biológicas satisfactorias *in vitro* de tipo hepatoprotectivas¹⁴, antimicóticas¹⁵, antibacteriales¹⁵, antivirales¹⁵ y antirradicálicas^{16,17,18} entre otras.

○ SILIMARINA

La silimarina es la mezcla de flavonoides extraídos del cardo mariano¹⁹ cuyo componente más estudiado es la silibina¹² (Figura 5).

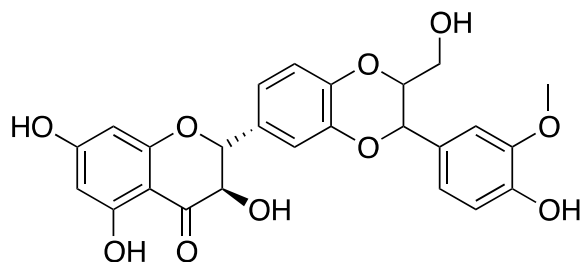


Figura 5. Estructura molecular de la silibina.

La silibina es a su vez una mezcla equimolar de diastereoisómeros, silibina A y silibina B³ (Figura 6).

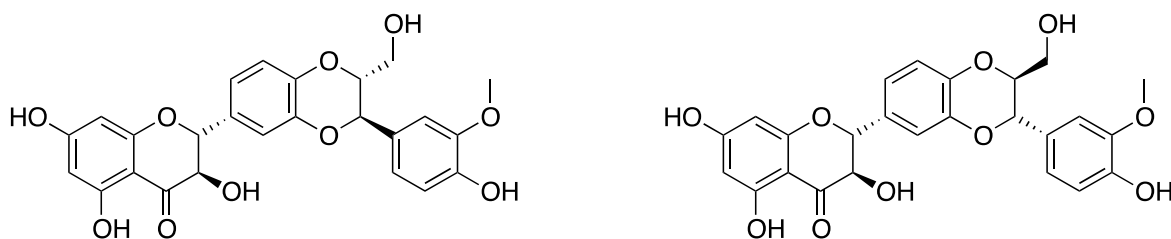


Figura 6. Silibina A y Silibina B respectivamente.

Aunque la silibina es el componente mayoritario de la silimarina²⁰, existen otros compuestos que se han extraído a lo largo de los años, entre los que destacan cinco principales: taxifolina, isosilibina A, isosilibina B, silicristina A y silidianina. Además, en la variedad de flor blanca de *silybum marianum* se han extraído otros compuestos como silandrina²¹, isosilandrina²², silimonina²¹ y siliamandina²³. La silimarina contiene además

un porcentaje variable, que oscila entre 10% y 30%, de compuestos polifenólicos desconocidos o no identificados. A esta fracción se le conoce como “fracción polimérica”.

3. ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE SILIBINA

La silibina fue aislada de la silimarina por primera vez en 1959 por Möschlin²⁴. En 1960 Janiak y Hänsel fueron los primeros en publicar la purificación de algunos flavonoides de la planta *Silybum marianum*, donde exponen las constantes fisicoquímicas básicas, así como la fórmula empírica²⁵. Cinco años más tarde, Wagner *et al.* nombraron a este compuesto, silibina y encontraron que disponía de cinco grupos hidroxilo; estos grupos podían ser acetilados y metilados²⁶. Sin embargo, la determinación de la fórmula molecular exacta, así como de la estructura completa no fue establecida hasta 1975.

El problema de la elucidación completa de la silibina sólo se había resuelto parcialmente porque la configuración absoluta de los centros quirales quedaba sin conocerse. La molécula de silibina presenta cuatro centros quirales (Figura 7). Pelter y Hänsel²⁷ propusieron atinadamente las configuraciones para los carbonos C-2 y C-3, y sugirieron igualmente las configuraciones para los carbonos C-10 y C-11, sin tener en cuenta que la silibina es en realidad una mezcla racémica de diastereoisómeros. En 1979, Arnone *et al.* publicaron la estructura completa de la silibina²⁸.

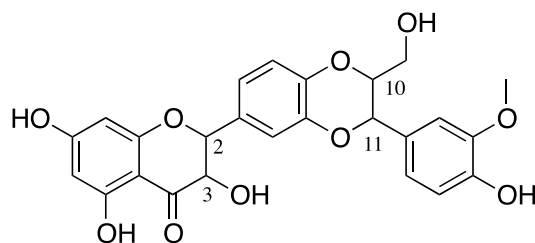


Figura 7. Centros quirales en la silibina.

4. COMPONENTES MAYORITARIOS DE SILIMARINA

Se desconoce con exactitud la proporción de los componentes mayoritarios en la silimarina, lo que constituye una dificultad en el trabajo sistemático con este tipo de compuestos^{29,30,31}. Está reportado que la concentración de silibina y demás componentes mayoritarios varía dependiendo del origen del cardo mariano²⁹. Los diastereoisómeros de silibina A y B, que en muchos casos son los componentes flavonoides mayoritarios y por lo tanto más estudiados, resultan ser componentes menores en algunas muestras, mientras que la silicristina, componente apenas apreciable en un buen número de plantas, resulta ser es el más abundante en otras.

Aunque la composición de los cuatro componentes principales (silibina, isosilibina, silicristina y silidianina) pueda variar de forma notable, resulta clara la relación de concentraciones entre pares de diastereoisómeros. Se conoce que²⁹:

Silibina A < Silibina B

Isosilibina A > Isosilibina B

Silicristina A >> Silicristina B

Silidianina (sólo un diastereoisómero reportado)

La falta de homogeneidad en la proporción de los componentes mayoritarios de silimarina supone un problema para fines prácticos de tipo médico, pues no se tiene la certeza de la composición de las muestras y se pone en riesgo la consistencia terapéutica de los flavonoides de la silimarina ya que cada componente tiene una actividad distinta³². Para fines médicos, las muestras con mayor proporción de silibina e isosilibina son las seleccionadas para trabajar pues son las que exhiben en mayor medida la actividad hepatoprotectiva.

5. PROPIEDADES QUÍMICAS DE SILIBINA

La Figura 8 presenta la silibina con la numeración sistemática de los anillos y los grupos funcionales más importantes.

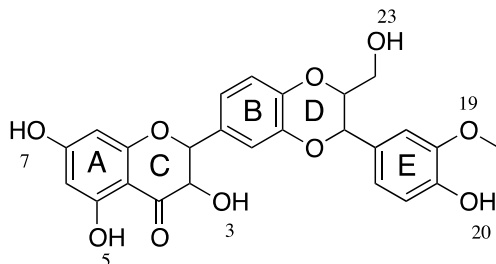


Figura 8. Estructura de la silibina con la numeración sistemática.

La silibina es una molécula pequeña que consta de 57 átomos ($PM=482g/mol$), pero con una riqueza y diversidad química muy interesantes, ya que tiene los anillos aromáticos y heterocíclicos alternados, y tiene cinco grupos hidroxilo que se encuentran repartidos alrededor de la molécula.

De estos cinco grupos $-OH$, hay tres de tipo fenólico en las posiciones R_7 , R_5 y R_{20} , uno secundario en la posición R_3 y otro primario en la posición R_{23} . Cada uno de ellos presenta distintas propiedades de reactividad química.

El grupo $-OH$ fenólico en posición R_5 es sin duda el más importante para explicar algunas de las propiedades químicas de la molécula, puesto que se encuentra unido por un puente de hidrógeno al carbonilo del anillo C. Esto implica que el grupo oxo se encuentre en conjugación con el anillo aromático A y confiera a la molécula mayor estabilidad^{3,20}.

Los otros grupos hidroxilos fenólicos presentan pequeñas pero importantes diferencias. El grupo situado en R_7 es más reactivo que el que se encuentra en R_{20} por la ausencia de impedimentos estéricos y porque no presenta interacción con otros grupos, como lo hace el grupo $-OH$ en R_{20} con el grupo metoxi situado en R_{19} o el grupo $-OH$ en R_3 con el grupo cetona del anillo C²⁰.

En cuanto a los otros dos grupos hidroxilo, los situados en R_3 y R_{23} pueden ser fácilmente oxidados^{3,20}. El grupo $-OH$ en R_3 puede oxidarse incluso con el oxígeno atmosférico y dar origen al derivado 2,3-dehidrosilibina (Figura 9); que es un importante derivado de la silibina³.

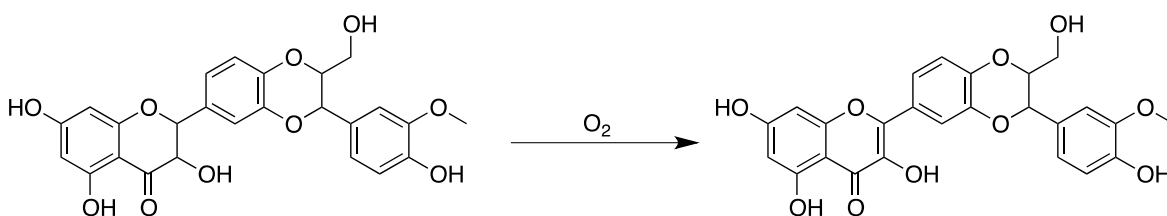


Figura 9. Conversión de silibina en el derivado 2,3-dehidrosilibina.

La conversión de silibina en el derivado 2,3-dehidrosilibina es un proceso muy estudiado. No se tiene muy claro si la 2,3-dehidrosilibina es un componente nativo de la silimarina o si se produce —en muy pequeñas cantidades— por reacciones de silibina con oxígeno³. Además, el derivado 2,3-dehidrosilibina presenta propiedades fisicoquímicas distintas y una actividad biológica diferente de su análogo hidrogenado, gracias a una deslocalización electrónica mucho más eficiente e importante y a la formación de una estructura plana entre los anillos A, B, C y D. El doble enlace modifica el ángulo diedro que une el grupo benzodioxano con los anillos C y D, lo cual modifica sustancialmente las propiedades electrónicas de la silibina³.

En la Figura 10 se presenta el mecanismo de reacción por el cual la silibina se oxida para formar el derivado 2,3-dehidrosilibina. De manera general, y bajo condiciones básicas, el oxígeno atmosférico oxida el grupo hidroxilo en posición R₃ para formar la cetona correspondiente, que a su vez sufre una condensación aldólica.

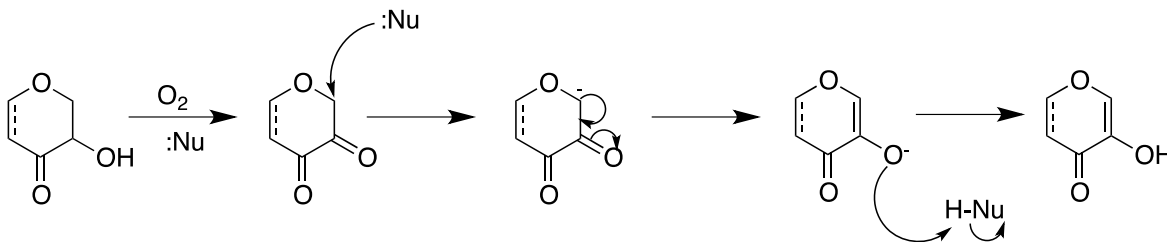


Figura 10. Mecanismo de reacción enfocado en el anillo C de la silibina mostrando la formación del doble enlace en la posición C2 y C3.

En la Figura 10, la nomenclatura :Nu, corresponde a un nucleófilo, es decir una especie química rica en electrones y con facilidad para enlazarse a un núcleo; esto es por definición una base de Lewis.

Pese a tener cinco grupos hidroxilo que son grupos polares, la molécula globalmente es hidrofóbica. La silibina es poco soluble en agua y en disolventes polares como metanol o etanol, sin embargo es soluble en disolventes polares apróticos como DMF, THF o acetona e insoluble en disolventes no polares como cloroformo o éter de petróleo³. Esto puede explicarse porque de los cinco grupos $-OH$ que se encuentran en la molécula, tres de ellos participan en puentes de hidrógeno intramoleculares²⁰. El grupo $-OH$ en R_5 forma un puente de hidrógeno intramolecular con el carbonilo adyacente. Este puente de hidrógeno es el más importante para entender la estabilidad química de la molécula. El grupo $-OH$ en R_3 forma otro puente de hidrógeno con el $C=O$, y la interacción del grupo $-OH$ en R_{20} con el oxígeno del grupo $-OCH_3$ en R_{19} forma el tercer puente de hidrógeno intramolecular. Los tres puentes de hidrógeno intramoleculares disminuyen el carácter hidrosoluble de la silibina³. Sólo los grupos $-OH$ en R_7 y en R_{23} podrían aportar un carácter hidrosoluble a la molécula.

La solubilidad es sin duda un parámetro importante para las aplicaciones médicas y se han llevado a cabo numerosos estudios para conocer más acerca de esta variable. Se tienen indicios sólidos de que la solubilidad aumenta como función del pH, y que aumenta igualmente como función de la temperatura^{33,34}.

Otro aspecto interesante de la silibina y de la mezcla compleja de la silimarina tanto en el aspecto médico como en el bioquímico es conocer qué especies se encuentran presentes a pH fisiológico y sobre todo en qué cantidad. Esto cobra especial interés sabiendo que a medida que se incrementa el pH de una disolución acuosa, la solubilidad de la silibina aumenta. Así, en disolución acuosa, la silibina se comporta como un ácido débil cuyo protón más ácido tiene un pKa igual a 7.7³⁵. El protón más ácido es aquel en posición R_7 (Figura 11). Esto se puede explicar gracias a que la carga negativa primero situada sobre el oxígeno es capaz de estabilizarse sobre todo el anillo A. Los demás pKa de la silibina reportados son pKa=11.0 para el grupo $-OH$ en posición 20³⁵. Otros valores de pKa reportados para la silibina son 7.0, 8.7, 9.57 y 11.66 para los grupos R_7 , R_5 , R_3 y R_{20} respectivamente³⁶. A pH fisiológico, es decir pH=7.4, una parte de la silibina se encontrará sin desprotonar.

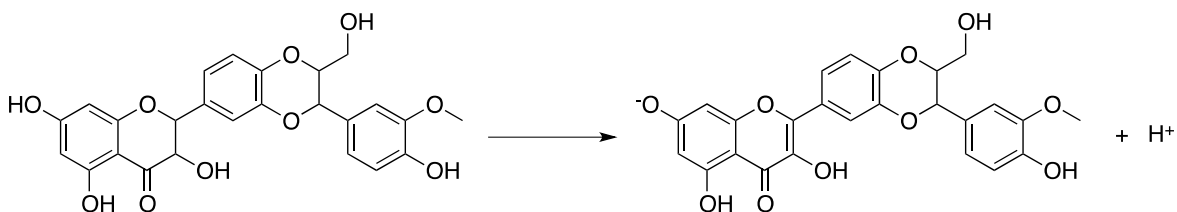


Figura 11. Reacción de desprotonación del protón más ácido de la silibina.

○ DERIVADOS METILADOS DE SILIBINA

Numerosos derivados de silibina se han sintetizado a lo largo de los años con un objetivo fundamental: explorar su capacidad como agentes biológicos. Se ha intentado aumentar la solubilidad en agua para hacerlos más efectivos para pruebas *in vitro*. También se han sintetizado derivados de silibina por cuestiones históricas con el afán de conocer con precisión la estructura de la silibina.

En este proyecto se presentarán los derivados metilados de la silibina pues son con los que se trabajó. Como se sabe la silibina tiene tres grupos hidroxilos fenólicos (R_5 , R_7 y R_{20}) y otros dos grupos $-OH$.

Experimentalmente²⁰, las metilaciones se han llevado a cabo en las posiciones R_7 , R_{20} y R_5 en ese orden, mientras que hay muy poca información sobre este tipo de reacciones en las posiciones R_3 o R_{23} , por lo que resulta interesante esterificar sistemáticamente los grupos hidroxilo y analizar cuestiones de estabilidad y reactividad.

6. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA SILIBINA

Las propiedades antioxidantes de la silibina se han comparado sistemáticamente con el derivado 2,3-dehidrosilibina pues se pueden llevar a cabo estudios de estructura-reactividad. La diferencia estructural y electrónica que supone el doble enlace en los carbonos C2 y C3 tiene consecuencias a la hora de inhibir procesos en donde se involucran radicales libres. El doble enlace provoca que la molécula sea prácticamente plana por lo que la deslocalización electrónica es más eficiente que en la silibina²⁰. La 2,3-

dehidrosilibina tiene una capacidad mucho mayor para estabilizar radicales^{3,20}. La estructura es capaz de modular, incrementar y favorecer un proceso antioxidante.

El derivado 2,3-dehidrosilibina es mucho mejor especie química antirradical que la silibina en los experimentos de estabilización del radical DPPH•, la inhibición de la peroxidación de lípidos microsomales o la inhibición de especies reactivas de oxígeno³.

Trouillas *et al.* reportaron que el mecanismo principal de inhibición de radicales libres para la silibina es el mecanismo de transferencia electrónica, mientras que la transferencia de átomo de hidrógeno es predominante en el compuesto 2,3-dehidrosilibina²⁰. Sin embargo no hay reportes experimentales o teóricos que tomen en cuenta la influencia del pH como un factor determinante, ni hay datos sobre el mecanismo de formación de aductos para estas sustancias.

En resumen, la actividad antioxidante de la silibina y de sus compuestos derivados está sujeta a parámetros estructurales como los grupos hidroxilo o la presencia del doble enlace en la molécula. Con base en esta información, aquí se presenta el estudio teórico de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina y algunos de sus derivados metilados y no metilados con la idea de analizar sus propiedades estructurales y antirradicálicas.

7. INTERACCIÓN DE LA SILIBINA CON CÚMULOS METÁLICOS

La interacción de biomoléculas con cúmulos metálicos para aumentar las señales de los espectros de caracterización es una idea desarrollada con éxito en los últimos años^{37,38}.

En el caso de la silibina hay indicios experimentales que muestran un aumento en las señales del espectro Raman debido a la presencia de plata. En la Figura 12 se presenta el espectro UV-Visible experimental de la silibina con nanopartículas de plata. Se observa que la intensidad asociada con la aparición del plasmón de plata va en aumento (417 nm), lo que parece indicar que hay una interacción de la silibina con iones plata que produce la formación de nanopartículas de plata. Las bandas asociadas a la silibina (283 y 320 nm) disminuyen mientras que la banda asociada con el plasmón (417 nm) aumenta conforme pasa el tiempo.

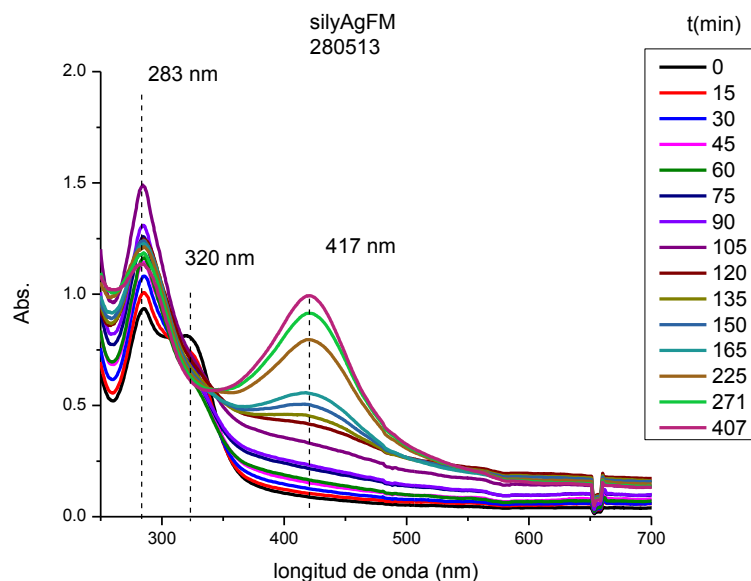


Figura 12. Espectro experimental UV-Visible de la silibina con y sin plata. Datos del Dr. Saniger (CCADET).

En el espectro Raman experimental de la silibina y el de silibina con nanopartículas de plata, parece que existe un incremento en las señales por la presencia de plata y se detecta una nueva señal alrededor de 600 cm^{-1} (información personal del Dr. Saniger). Estos resultados se asocian empíricamente con la presencia de nanopartículas de plata que son las que se quieren estudiar teóricamente.

Con base en los resultados experimentales, aquí se presenta un estudio de la interacción de silibina con cúmulos neutros de cuatro átomos de Cu, Ag y Au. El motivo de esta elección es que se tiene conocimiento de que a partir de un pequeño conjunto de cuatro átomos de plata se puede formar la imagen latente de una fotografía³⁹. Esto quiere decir que a partir de ese sistema, la plata interactúa con la región visible del espectro de UV-visible.

Para el Cu y el Au no se tienen resultados experimentales pero se incluyen en este trabajo porque pertenecen al mismo grupo que la Ag, y porque el Cu y el Au tienen características particulares, como una baja toxicidad y efectos relativistas, respectivamente.

De esta forma se estudia cuál de los tres metales del grupo 11 puede modificar en mayor medida los espectros Raman y UV-visible, y se investiga la capacidad antirradicálica de la silibina al interactuar con estos tres metales.

La principal razón para estudiar la interacción de cúmulos de Cu con silibina es la de ofrecer una alternativa válida, con información teórica, donde se puede sustituir la plata por el cobre para disminuir la toxicidad del metal de interacción. El cobre es uno de los 26 metales esenciales para el ser humano⁴⁰ y aunque se encuentra en trazas en el cuerpo algunas de sus funciones son cruciales. Por otra parte, el oro siempre presenta comportamientos particulares de interés por sus efectos relativistas.

Además de estudiar la interacción de la silibina con estos cúmulos metálicos, se analizó la interacción de esta molécula con cúmulos mixtos binarios y ternarios para estudiar el efecto de la naturaleza y el tamaño del cúmulo tanto en los espectros de caracterización como en la actividad antirradicálica. Los resultados de este trabajo podrían tener aplicación en un futuro cercano.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Morazzoni, P.; Bombardelli, E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* **1995**, *LXVI*, 3-42.
2. Schuppan, D.; Jia, J.D.; Brinkhaus, B.; Hahn, E.G. Herbal products for liver diseases: A therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology* **1999**, *30*, 1099-1104.
3. Biedermann, D.; Vavrikova, E.; Cvak, L.; Kren, V.; Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 1077-1232.
4. Saller, R.; Meier, R.; Brignoli, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **2001**, *61*, 2035-2063.
5. Loguercio, C.; Festi, D. Silybin and the liver: From basic research to clinical practice, *World J. Gastroenterol.*, **2011**, *17*, 2288-2301.
6. Wellington, K.; Jarvis, B. Silymarin: A Review of its Clinical Properties in the Management of Hepatic Disorders. *BioDrugs*, **2001**, *15*, 465-489.
7. Balian, S.; Ahmad, S.; Zafar, R. Antiinflammatory activity of leaf and leaf callus of *Silybum marianum* (*L.*) *Gaertn.* in albino rats. *Indian J. Pharmacology*, **2006**, *38*, 213-214.
8. Agarwal, R.; Agarwal, C.; Ichikawa, H.; Singh, R.P.; Aggarwal, B.H. Anticancer Potential of Silymarin: From Bench to Bed Side. *Antican. Res.* **2006**, *26*, 4457-4498.
9. Mira, L.; Silva, M.; Manso, C.F. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 753-759.

10. Gazák, R.; Svobodová, A.; Psotová, J.; Sedmera, P.; Prikrylová, V.; Walterová, D.; Kren, V. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5677–5687.
11. Jain, A.; Dwivedi, N.; Bhargava, R.; Flora, S.J.S. Silymarin and naringenin protects nicotine induced oxidative stress in young rats. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, **2012**; *1*, 41-49.
12. Simanek, V.; Kren, V.; Ulrichova, J.; Vicar, J.; Cvak, L. Silymarin: what is in the name...? An appeal for a change of editorial policy, *Hepatology*, **2000**, *32*, 442-444.
13. Herrmann, K., Flavonols and flavones in food plants: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, **1976**, *11*, 433–448
14. Hyuncheol, O.; Do-Hoon, K.; Jung-Hee, C.; Youn-Chul, K. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*, *J. Ethnopharmacology*, **2004**, *95*, 421-424.
15. Orhan, D.D.; Ozcelik, B.; Ozgen, S.; Ergun, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Res.*, **2010**, *165*, 496-504
16. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plants Science*, **1997**, *2*, 152-159.
17. Martínez, A. Donator Acceptor Map of Psittacofulvins and Anthocyanins: are they good antioxidant substances? *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 4915-4921.
18. Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572-584.

19. Wagner, H.; Hörhammer, L.; Münster, R. On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum*(L) Gaertn. (*Carduus marianus* L.) *Arzneimittelforschung*, **1968**, *18*, 688-696.
20. Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gazak, R.; Hrbáč, J.; Sedmera, P.; Kren, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.L.; et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1054-1063.
21. Szilagi, I.; Tetenyi, P.; Antus, S.; Seligmann, O.; Chari, V.M.; Seitz, M.; Wagner, H. Structure of silandrin and silymonin, two new flavonolignans from a White blooming silybum marianum variety, *Planta Med.*, **1981**, *43*, 121-127.
22. Samu, Z.; Nyiredy, S.; Baitz-Gacs, E.; Varga, Z.; Kurtan, T.; Dinya, Z.; Antus, S. Structure elucidation and antioxidant activity of (-)-isosilandrin isolated from silybum marianum, *Chem. Biodiversity.*, **2004**, *1*, 1668-1677.
23. MacKinnon, S.L.; Hodder, M.; Craft, C.; Simmons-Boyce, J. Silyamandin, a new flavonolignan isolated from milk thistle tinctures, *Planta Med.*, **2007**, *73*, 1214-1216.
24. Moschlin, G. PhD Thesis, Karlsruhe University, 1959.
25. Janiak, B.; Hansel, R. Phytochemisch-pharmakognostische untersuchungen uber fructus cardui Mariae, *Planta Med.*, **1960**, *8*, 71-84.
26. Wagner, H.; Horhamme, L.; Munster, R. *Naturwissenschaften*, **1965**, *52*, 305.
27. Pelter, A; Hansel, R. The structure of silybin (silybum substance E₆), the first flavonolignan, *Tetrahedron Lett*, **1968**, *9*, 2911-2916.

28. Arnone, A.; Merlini, L.; Zanarotti, A. Constituents of silybum marianum. Structure of isosilybin and stereochemistry of silybin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 696-697.
29. Smith, W.A.; Lauren, D.R.; Burguess, E.J.; Perry, N.B.; Martin, R.J. A silychristin isomer and variation of flavonolignan levels in milk thistle (*silybum marianum*) fruits, *Planta Med.*, **2005**, *71*, 877-880.
30. Mahady, G.B.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R. Botanical dietary supplements: quality, safety and efficacy. Lisse and zeitlinger, **2001**.
31. Kvaniscka, F.; Biba, B.; Sevcik, R.; Voldrich, M.; Kratka, J. Analysis of the active components of silymarin, *J.Chromatogr. A*, **2003**, *990*, 239-245.
32. Dvorak, Z.; Kosina, P.; Walterova, D.; Simanek, V.; Backhleda, P.; Ulrichova, J. Primary cultures of human hepatocytes as a tool in citotoxicity studies: cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *silybum marianum*. *Toxicol. Lett.*, **2003**, *137*, 201-212.
33. Bai, T.C.; Zhu, J.J.; Hu, J.; Zhang, H.L.; Huang, C.G. Solubility of silybin in aqueous poly(ethylene glycol) solution, *Fluid Phase Equil.*, **2007**, *254*, 204-210.
34. Koch, H.; Zinsberger, G. Löslichkeitsparameter von Silybin, Silydianin und Silychristin, *Arch. Pharm.*, **1980**, *313*, 526-533.
35. Van Wenum, E.; Jurczakowski, R.; Litwinienko, G. Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of enol groups. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 9102-9112.

36. Meloun, M.; Burkonova, D.; Syrovy, T.; Vrana, A. Thermodynamic dissociation constants of silychristin, silybinin, silydianin and mycophenolate by the regression analysis of spectrophotometric data. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, *486*, 125-141.
37. Tabarin T.; Kulesza, A.; Antoine, R.; Mitrić, R.; Broyer, M.; Dugourd, P.; Bonačić-Koutecký, V. Absorption Enhancement and Conformational Control of Peptides by Small Silver Clusters, *Phys. Rev. Lett.* , **2008**, *101* , 213001.
38. Compagnon, I.; Tabarin, T.; Antoine, R.; Broyer, M.; Dugourd, P.; Mitric, R.; Petersen, J.; Bonačić-Koutecký, V. Spectroscopy of isolated, mass-selected tryptophan-Ag₃ complexes: A model for photoabsorption enhancement in nanoparticle-biomolecule hybrid systems, *J. Chem. Phys.*, **2006**, *125*, 164326
39. Leisner, T.; Rosche, C.; Wolf, S.; Granzer, F.; Woste, L. The catalytic role of small coinage-metal clusters in photography, *Surf. Rev. Lett.*, **1996**, *3*,1105.
40. Lippard, S.J. Bioinorganic chemistry: a maturing frontier, *Science*, **1993**, *261*(5122), 699-700.

9. REFERENCIAS IMÁGENES

1. Figura 1 a. <http://www.salus.de/heilpflanzen-lexikon/details/pflanze/ansicht/mariendistel.html>, visitado por última vez 17/09/15.
2. Figura 1 b. <http://imageenvision.com/illustration/14213-picture-of-blessed-milk-thistle-silybum-marianum-by-jvpd>, visitado por última vez 17/09/15.
3. Figura 2 http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_HLV344&res=640, visitado por ultimo vez 17/09/15.
4. Figura 3 <http://www.discoverlife.org/20/q?search=Silybum+marianum>, visitado última vez 17/09/15

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

- ❖ Comparar la silibina y la 2,3-dehidrosilibina en términos de sus diferencias estructurales, electrónicas y espectroscópicas para proponer un método analítico de seguimiento de la oxidación de silibina a 2,3-dehidrosilibina.
- ❖ Estudiar la capacidad para atrapar radicales libres de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina y algunos de sus derivados a pH=7.4 en términos de los mecanismos de transferencia electrónica y de formación de aductos.
- ❖ Analizar las interacciones de los cúmulos de cuatro átomos de Cu, Ag y Au con la silibina cuando se encuentran neutros o cargados con los estados de oxidación más representativos de cada metal y determinar los efectos de los cúmulos de Cu, Ag y Au en los espectros de caracterización Raman y UV-visible.
- ❖ Estudiar cómo una serie de cúmulos mixtos binarios y ternarios de Cu, Ag y Au al interactuar con la silibina pueden modular las propiedades antirradicálicas y determinar cómo la naturaleza, y el tamaño de los cúmulos afectan los espectros de caracterización de la silibina.

CAPÍTULO 3: MARCO TEÓRICO

1. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD

La Teoría de Funcionales de la Densidad se basa en los trabajos de Thomas y Fermi realizados en 1927. El modelo de Thomas-Fermi utiliza la densidad electrónica para encontrar la energía del estado basal del sistema. Este modelo toma en cuenta la energía cinética del sistema como la de un gas uniforme de electrones y considera de manera clásica las interacciones núcleo-electrón y electrón-electrón. Sin embargo, para que la Teoría de Funcionales de la Densidad tomara forma hubo que esperar hasta 1964 cuando Hohenberg y Kohn¹ postularon los dos teoremas fundamentales de esta teoría que demuestran que el modelo de Thomas-Fermi puede ser considerado como una aproximación de una teoría exacta llamada la Teoría de Funcionales de la Densidad.

El primer teorema de Pierre Hohenberg y Walter Kohn establece que la energía de un sistema de N electrones es un funcional de su densidad electrónica.

$$E_0 = \int \rho_0(r)v(r)dr + F_{HK}[\rho_0] \quad (1)$$

Donde $F_{HK}[\rho_0]$ es el funcional universal de Hohenberg-Kohn que no depende explícitamente del potencial externo y es válido para átomos, moléculas y sistemas expandidos. Este funcional se define como

$$F_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] \quad (2)$$

Para un sistema basal no degenerado, la energía y todas las propiedades que se pueden conocer pueden ser descritas por la densidad electrónica, $\rho_0(x,y,z)$.

El segundo teorema se relaciona con el principio variacional:

Para una densidad de prueba $\tilde{\rho}(r)$ tal que $\tilde{\rho}(r) \geq 0$ y $\int \tilde{\rho}(r)dr=N$ debe cumplirse

$$E_0 \leq E_{V_{ext}}[\tilde{\rho}]$$

Esto quiere decir que si y sólo si se introduce la densidad electrónica exacta del estado basal se encontrará la energía del estado basal.

Para calcular la energía total de un sistema a partir de la densidad electrónica Kohn y Sham² propusieron una aproximación que permite desarrollar de forma práctica estos teoremas. Esta aproximación se puede resumir en tres puntos principales:

1. Se supone un sistema de N electrones no interactuantes; con lo cual cada electrón se puede representar con una función $\phi_i(\vec{r})$ (orbitales de Kohn y Sham). Así, la energía cinética T_S corresponde a la suma de energías cinéticas individuales

$$T_S = \sum_{i=1}^N \int d\vec{r} \phi_i^*(\vec{r}) \left(-\frac{1}{2}\nabla^2\right) \phi_i(\vec{r}) \quad (3)$$

y la densidad electrónica es la suma de las densidades orbitales.

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N \rho_i(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N \phi_i^*(\vec{r}) \phi_i(\vec{r}) \quad (4)$$

Los orbitales de Kohn y Sham son aquellos que satisfacen las ecuaciones integrodiferenciales de Kohn y Sham.

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{eff}(\vec{r})\right) \phi_i(\vec{r}) = E_i \phi_i(\vec{r}) \quad (5)$$

2. Se establece que la interacción entre electrones puede ser descrita por dos términos: uno clásico que se refiere a la interacción repulsiva entre electrones y el otro no clásico, según la forma:

$$V_{ee}[\rho_0] = J[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (6)$$

donde

$$J[\rho_0] = \int \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (7)$$

y r_{12} es la distancia entre electrones y E_{xc} el funcional de intercambio y correlación, el término no clásico. Con esto el funcional universal $F_{HK}[\rho_0]$ está descrito como

$$F_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] = T_S[\rho_0] + J[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (8)$$

donde el funcional de intercambio y correlación tiene la forma:

$$E_{xc}[\rho_0] = T[\rho_0] - T_S[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] - J[\rho_0] \quad (9)$$

3. Se propone un potencial en el sistema que genere la densidad electrónica del estado basal, el potencial de Kohn y Sham $V_{eff}(\vec{r})$ que incorpora los efectos de interacción entre los electrones y también los de un posible potencial externo $V_{ext}(\vec{r})$. El potencial de Kohn y Sham se define como:

$$V_{eff}(\vec{r}) = \int d\vec{r}' \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} + \frac{\delta E_{xc}[\rho(\vec{r})]}{\delta \rho(\vec{r})} + V_{ext}(\vec{r}) \quad (10)$$

El segundo término $\frac{\delta E_{xc}[\rho(\vec{r})]}{\delta \rho(\vec{r})}$ se conoce como el potencial de intercambio y correlación, $V_{xc}[\rho]$, y es por el que se emplean expresiones aproximadas.

El mayor problema de la Teoría de Funcionales de la Densidad es que no se conoce con exactitud el término de energía de intercambio y correlación, por lo que se utilizan diversas aproximaciones para su determinación.

- ENERGÍA DE INTERCAMBIO Y CORRELACIÓN

Entre de los métodos para describir el funcional de intercambio y correlación, E_{xc} se encuentran la aproximación de la densidad local (LDA), la aproximación de la densidad de spin local (LSDA), la aproximación de gradiente corregido (GGA), los funcionales híbridos y los meta-GGA.

Las aproximaciones de LDA y LSDA se basan en el modelo del gas de electrones uniformes donde se concibe que la densidad electrónica varía muy lentamente con respecto a la posición. Mientras que el funcional LDA es sólo función de la ρ , el funcional LSDA es función de ρ^α y ρ^β , es decir de las densidades de electrones con espín α y espín β , respectivamente.

La siguiente aproximación fue suponer que la densidad electrónica del sistema no era un continuo y que podía mostrar variaciones. Se toma en cuenta el gradiente de la densidad electrónica de spines. A estos métodos se les conoce como aproximación del gradiente generalizado (GGA) y se utilizan algunas veces para modelar cúmulos pequeños. Los funcionales híbridos como el B3LYP consideran el intercambio exacto Hartree-Fock, y los meta-GGA como el M06 consideran con más detalle la variación de la densidad electrónica.

- FUNCIONALES

En este trabajo se utilizaron dos funcionales, el funcional de Truhlar M06 y el funcional híbrido B3LYP. A continuación se detalla la forma explícita de cada uno.

- FUNCIONAL M06

El funcional M06 es un funcional meta-GGA que se caracterizan por tomar en cuenta explícitamente la dependencia de la densidad de espín en la energía cinética³.

El intercambio en este funcional está dado en términos de las densidades del intercambio $\epsilon_{X\sigma}^{PBE}$, el intercambio exacto $\epsilon_{X\sigma}^{LSDA}$, y funciones de peso $f(\omega_\sigma)$, $h_X(x_\sigma, z_\sigma)$ parametrizadas.

El término $f(\omega_\sigma)$ es justamente el que toma en cuenta la densidad de espín en la energía cinética.

$$E_X^{M06} = \sum_{\sigma} \int dr [F_X^{PBE}(\rho_{\sigma}, \nabla \rho_{\sigma}) f(\omega_{\sigma}) + \varepsilon_X^{LSDA} h_X(x_{\sigma}, z_{\sigma})] \quad (11)$$

La correlación está dada de diferente forma según la alineación paralela o antiparalela de los espines.

$$E_C^{\sigma\sigma} = \int e_{\sigma\sigma}^{UEG} [g_{\sigma\sigma}(x_{\sigma}) + h_{\sigma\sigma}(x_{\sigma}, z_{\sigma})] D_{\sigma} dr \quad (12)$$

$$E_C^{\alpha\beta} = \int e_{\alpha\beta}^{UEG} [g_{\alpha\beta}(x_{\alpha}, x_{\beta}) + h_{\alpha\beta}(x_{\alpha\beta}, z_{\alpha\beta})] dr \quad (13)$$

- FUNCIONAL B3LYP

Los funcionales híbridos como B3LYP mezclan el intercambio exacto de Hartree-Fock con los funcionales de gradiente corregido. El funcional B3LYP es un funcional híbrido^{4,5} definido por

$$E_{XC}^{B3LYP} = aE_X^{EE} + (1 - a)E_X^{LDA} + b\Delta E_X^{B88} + E_C^{LDA} + c\Delta E_C^{PW91} \quad (14)$$

En esta mezcla de funcionales, se toman las partes GGA de los funcionales de intercambio de Becke88, y de correlación PW91; además, la parte más importante del funcional B3LYP son los términos de ajuste empíricos a , b y c que se fijaron al tratar de reproducir lo mejor posible valores experimentales. El funcional B3LYP se utiliza ampliamente por su calidad en la predicción de geometrías del estado base.

○ BASES Y PSEUDOPOTENCIAL

Un conjunto de funciones base son las funciones matemáticas a partir de las cuales se puede obtener una representación de los orbitales. Los orbitales atómicos se representan matemáticamente por expresiones del tipo

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = R_{n,l}(r)Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (15)$$

Donde el término $R_{n,l}(r)$ corresponde a la parte radial y $Y_{l,m}(\theta, \phi)$ a la parte angular expresada en función de los armónicos esféricos.

Los dos tipos de funciones más utilizadas para obtener la parte radial son las funciones tipo Slater y las funciones Gaussianas. Estos dos tipos de funciones difieren en la forma de expresar la parte radial de la función de onda. Para las funciones tipo Slater se tiene

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = Nr^{n-1}e^{-\zeta r}Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (16)$$

mientras que para las funciones Gaussianas, la parte radial se expresa como

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = Nr^{n-1}e^{-\zeta r^2}Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (17)$$

donde ζ es el exponente orbital, N la constante de normalización y n el número cuántico principal. La única diferencia es el exponente cuadrático asociado al exponente orbital en las funciones Gaussianas, que no existe en las funciones tipo Slater.

La elección de la base de cálculo es un parámetro de suma importancia en química computacional y por ello existen distintos conjuntos de funciones base, cada uno de ellos destinado a resolver un problema específico. A continuación se presenta la clasificación del tipo de bases que se utilizaron en este trabajo.

- BASE 6-31+G(d)

La base utilizada para llevar a cabo los cálculos en este trabajo es la base 6-31+G(d). Esta base utiliza una función contraída, combinación lineal de seis funciones primitivas gaussianas para describir la capa interna, mientras que la capa de valencia utiliza dos funciones, una interna formada por la combinación lineal de tres funciones primitivas y otra externa descrita por una función primitiva.

La base 6-31+G(d) cuenta con polarización lo que quiere decir que se le adicionaron orbitales con mayor momento angular respecto al requerido para el estado basal de cada átomo. De esta forma los orbitales d pueden añadir polarización a los orbitales p . Además, es una base con funciones difusas que sirven para mejorar la descripción de los electrones más alejados del núcleo. Estas bases se construyen añadiendo a cada átomo un conjunto de funciones con coeficientes orbitales muy pequeños (s , p_x , p_y , p_z) que sirven para que los orbitales ocupen un espacio mayor y así se describan mejor las regiones más alejadas de los centros nucleares.

- BASE 6-311+G(d,p)

Con la base 6-311+G(d,p) se llevaron a cabo los cálculos *single point* de las geometrías optimizadas para refinar aspectos electrónicos en los sistemas estudiados.

Al igual que la base 6-31+G(d), esta base es de valencia desdoblada, donde se adicionaron un par de términos. Se aumentó el número de funciones utilizadas para describir la capa de valencia. La base 6-311+G(d,p) cuenta con una función externa adicional descrita por una función primitiva, y se le añadió también a cada átomo de hidrógeno un conjunto de orbitales $2p$ para describir con mayor precisión las especies aniónicas.

- PSEUDOPOTENCIAL LANL2DZ

Los pseudopotenciales son funciones de base que se utilizan generalmente para la descripción de átomos pesados, elementos a partir del cuarto periodo de la Tabla Periódica, y se caracterizan por separar la descripción electrónica de los átomos en dos partes. Se

consideran los electrones internos y el núcleo como una unidad con una carga específica y los electrones de valencia se tratan por separado. La utilización de pseudopotenciales hace más eficientes los cálculos computacionales ya que se reduce el tamaño de las funciones base y permite un tratamiento adecuado de los efectos relativistas.

En este trabajo se utilizó el pseudopotencial LanL2DZ desarrollado por Hay y Wadt en el Laboratorio Nacional de Los Álamos⁶. Este pseudopotencial ha sido ampliamente utilizado en química cuántica, particularmente en el estudio de compuestos o cúmulos que contienen elementos pesados ($Z > 38$).

Las funciones bases LanL2DZ son comúnmente empleadas en cálculos de DFT, donde predicen correctamente los estados atómicos para metales de transición, debido a que se ajusta para elementos después del tercer periodo ($n > 3$) y con orbitales de valencia nd , $(n+1)s$ y $(n+1)p$. Este pseudopotencial toma 19 electrones de valencia para describir los átomos del grupo 11 (Cu, Ag y Au).

2. MECANISMOS DE REACTIVIDAD

Uno de los aspectos más importantes de este proyecto es el análisis de la capacidad antirradicálica de los sistemas de estudio utilizando parámetros electrónicos a partir de la Teoría de Funcionales de la Densidad. En esta sección se presentarán dos mecanismos de reacción ampliamente trabajados y reportados en la bibliografía: el mecanismo de transferencia electrónica y el de formación de aductos.

○ TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

En este trabajo el mecanismo de transferencia electrónica se investiga en dos direcciones: como la capacidad que tiene una sustancia para donar electrones y la capacidad para aceptarlos. Este análisis se puede estudiar a partir de la energía de ionización (E.I.) y afinidad electrónica (A.E.) verticales de los sistemas.

La energía de ionización se define como la energía requerida para quitar un electrón de un sistema aislado en fase gas. Valores bajos de energía de ionización indican que será poco

costoso energéticamente que el sistema se desprenda de un electrón y por lo tanto será capaz de donar electrones con un costo de energía bajo. Aquellas sustancias con bajas energías de ionización serán buenos donadores electrónicos.

Por otro lado, la afinidad electrónica es la energía de ionización del anión. Este fenómeno se representa mediante la ecuación química siguiente



Donde A^{-} representa la especie aniónica y A^{0} , la especie neutra oxidada por la transferencia de un electrón.

Valores altos de afinidad electrónica indican que será una situación favorecida termodinámicamente que el sistema acepte un electrón y por lo tanto, aquellos sistemas con altos valores de afinidad electrónica serán buenos aceptores electrónicos.

Los valores de energía de ionización y afinidad electrónica proveen información importante sobre cómo se comporta una sustancia en términos de donación y aceptación de electrones, sin embargo resulta más interesante comparar estos valores para distintas sustancias. Para ello, se utilizó el FEDAM, Figura 1, (*Full electron donator-acceptor map*) o mapa donador-aceptor de electrones^{7,8}. Este mapa es una herramienta gráfica muy útil que permite comparar fácil y cuantitativamente los sistemas en función de su capacidad para donar y aceptar electrones.

El mapa se construye con la energía de ionización en el eje de las ordenadas y la afinidad electrónica en el eje de las abscisas. Un sistema ubicado abajo a la izquierda será un buen donador de electrones, mientras que uno que se encuentre arriba a la derecha será un buen aceptor de electrones. Las especies que se sitúen en estas dos regiones del mapa serán buenos donadores y aceptores de electrones respectivamente. La transferencia de carga podrá entonces llevarse a cabo; ésta será en el sentido de la región de buenos donadores hacia los buenos aceptores.

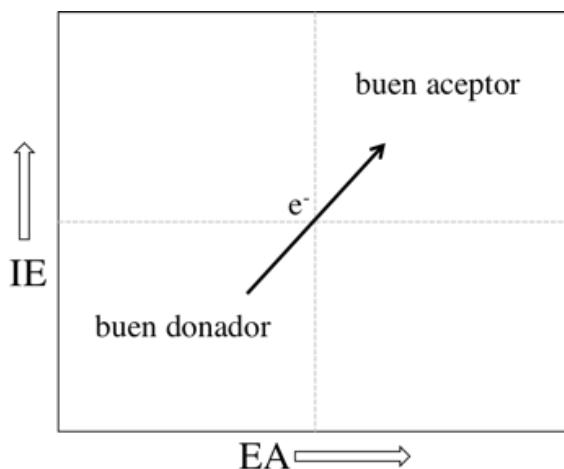


Figura 1. Regiones del FEDAM (*Full electron donor-acceptor map*).

○ FORMACIÓN DE ADUCTOS

La formación del aducto radical es un mecanismo que estabiliza un radical libre mediante la unión a una molécula antirradicálica. En este trabajo se estudió la disociación del aducto radical, es decir



Donde $[R\text{-anti}]\bullet$ representa el producto de adición, aducto, constituido por la unión de molécula antirradicálica y el radical libre, $R\bullet$ es el radical libre, y *anti*, la molécula antirradicálica.

La manera cuantitativa de medir qué tan eficaz puede ser una sistema antirradicálico para estabilizar un radical libre es obteniendo la energía de disociación del aducto. Para el estudio de la disociación de los aductos de los derivados de silibina y 2,3-dehidrosilibina con el radical libre $\bullet\text{OOH}$ se utilizaron las diferencias totales de energías.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogenous electron gas, *Phys. Rev. B*, **1964**, *136*, 864
2. Kohn, W.; Sham, L.J. Self consistent equations including Exchange and correlation effects, *Phys. Rev. A*, **1965**, *140*, 1133
3. Zhao, Y.; Truhlar, D.G., The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theor. Chem. Account*, **2008**, *120*, 215-241.
4. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J.Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 5648.
5. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785.
6. Hay, P.J.; Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations - potentials for the transition-metal atoms Sc to Hg, *J. Chem. Phys.*, **82** (1985) 270-83.
7. Martínez, A. Donator acceptor map of psittacofulvins and anthocyanins: are they good antioxidant substances? *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113(14)*, 4915-4921.
8. Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M.A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 9037-9042.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE SILIBINA, 2,3-DEHIDROSILIBINA Y SUS DERIVADOS METILADOS

La molécula de silibina, con sus propiedades electrónicas, fisicoquímicas y antirradicálicas, constituye el punto de inicio de este trabajo teórico. Además, el estudio contempla a la 2,3-dehidrosilibina, derivado deshidrogenado de la silibina. Esto es importante pues se conoce que en condiciones normales de presión y temperatura puede darse la transformación por oxidación de silibina en su derivado deshidrogenado¹. Desde el punto de vista experimental, se puede seguir analíticamente la evolución de la silibina a 2,3-dehidrosilibina y descartar o saber en qué medida se ha llevado a cabo la oxidación.

Se estudió también una serie de seis compuestos monometilados derivados de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina (Figuras 1 y 2) para analizar sus propiedades antirradicálicas teniendo en cuenta su abundancia a pH fisiológico.

○ METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo, todos los cálculos fueron efectuados utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad y el código Gaussian09².

Para el estudio de reactividad y caracterización espectroscópica de silibina, 2,3-dehidrosilibina y sus derivados se utilizó el funcional M06 y la base 6-31+G(d) para los cálculos de geometrías y estructura electrónica. Para cada geometría optimizada se hizo un análisis de frecuencias y se descartó la existencia de frecuencias imaginarias para corroborar que las geometrías obtenidas del cálculo correspondieran a un mínimo de energía y aseverar que la estructura obtenida fuera la más estable. Todos los cálculos fueron realizados en fase gas.

Se obtuvieron los espectros Raman al realizar un análisis de las frecuencias relacionado con los sistemas. Los espectros de absorción UV-visible se calcularon mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad dependiente del tiempo con el nivel de teoría M06/6-31+G(d).

El mecanismo de transferencia electrónica implicó la obtención de las energías de ionización y afinidades electrónicas verticales de cada sistema. Para ello se partió de la estructura optimizada que fue mejorada con el funcional M06 y con la base 6-311+G(d,p). A partir del resultado de la estructura neutra mejorada se calcularon las especies aniónicas y catiónicas considerando la geometría fija. Después se construyeron los distintos FEDAM que se presentan en este trabajo. Los efectos del disolvente se calcularon con el modelo de solvatación SMD³ con agua y DMSO como disolventes polar y no polar.

El parámetro químico que se utilizó para determinar la capacidad antirradicálica de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina y los diferentes derivados estudiados fue la energía de disociación del aducto del radical libre, ΔE_d . Se llevó a cabo la adición del radical libre $\bullet\text{OOH}$ en todos los C-C de doble enlace y los átomos de oxígeno que al adicionarse el radical libre superóxido pudieran formar puentes de hidrógeno. La energía de disociación se determinó mediante la siguiente ecuación

$$\Delta E_d = \{[E(\bullet\text{OOH}) + E(\text{anti})] - E[\text{OOH-anti}]\bullet\}$$

donde $\text{OOH}\bullet$ es el radical libre superóxido, *anti*, la molécula antirradicálica y $[\text{OOH-anti}]\bullet$, el producto de adición, aducto, constituido por la unión de la molécula antirradicálica y el radical libre. Para concluir el estudio de disociación del aducto $\bullet\text{OOH}$ se realizó un análisis de los valores de ΔE_d en relación con los átomos de adición. Dependiendo de la cantidad de valores positivos, es decir de las reacciones termodinámicamente favorecidas a la formación del aducto, y la magnitud de esos valores se determinó cuál de las moléculas estudiadas tenía, según este mecanismo, una mejor capacidad antirradicálica.

El mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno se ha utilizado sistemáticamente para estudiar los compuestos de tipo flavonoide y su capacidad para inhibir radicales libres. En el Apéndice B se presenta este estudio para las moléculas de silibina y 2,3-dehidrosilibina, así como un breve análisis de los resultados obtenidos.

○ OPTIMIZACIÓN DE GEOMETRÍAS

En la Figura 1 se presentan las representaciones moleculares de silibina y 2,3-dehidrosilibina con la numeración sistemática.

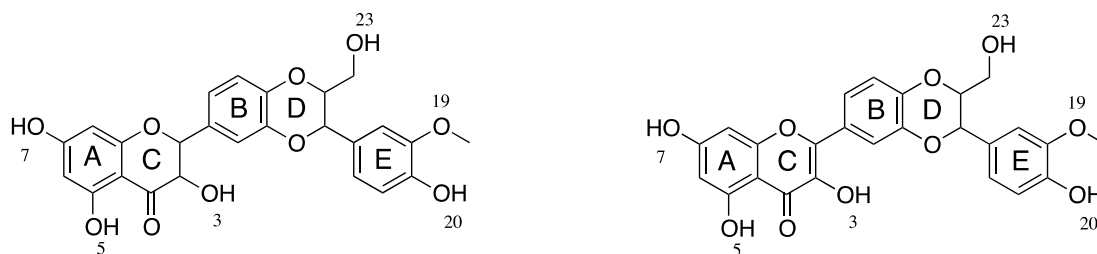


Figura 1. Representación molecular de silibina y 2,3-dehidrosilibina.

En las Figuras 2 y 3 se presentan las representaciones moleculares de las estructuras así como las imágenes de las geometrías optimizadas de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina, los derivados monometilados y las estructuras sin grupos metoxi (nor-silibina y nor-2,3-dehidrosilibina). Además, para los isómeros monometilados se presenta la diferencia de energía que existe entre ellos. En las Figuras 2 y 3 están enmarcados con una línea punteada.

El aspecto estructural que diferencia estas dos familias de moléculas es el doble enlace en los carbonos C2-C3 que presentan la 2,3-dehidrosilibina y sus derivados. Este doble enlace es responsable de la planaridad y deslocalización electrónica en la 2,3-dehidrosilibina, que no existe en la silibina, y que modifica sus propiedades químicas⁴.

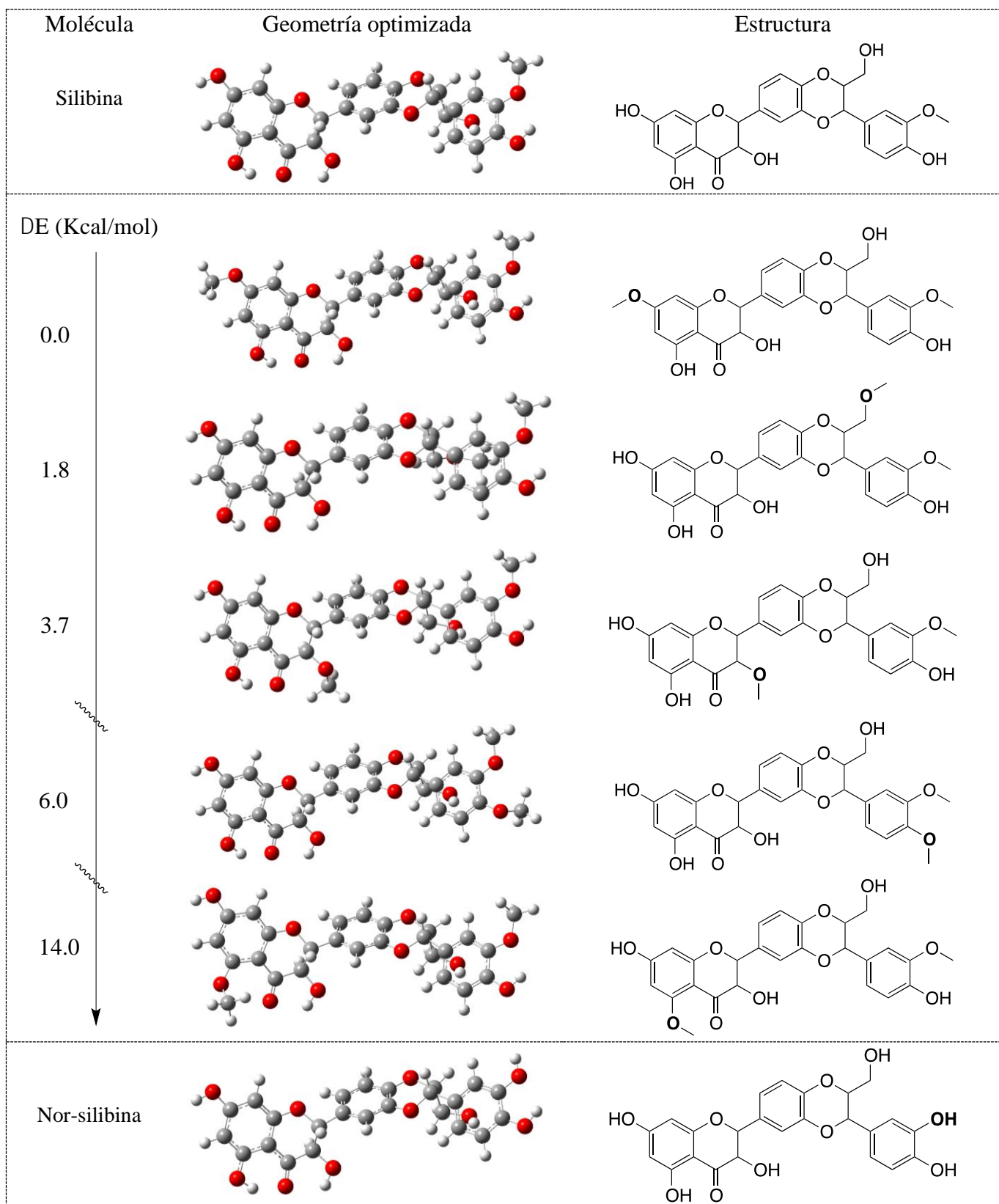


Figura 2. Representación molecular de las estructuras estudiadas y diferencia de energía entre distintos isómeros monometilados de la silibina.

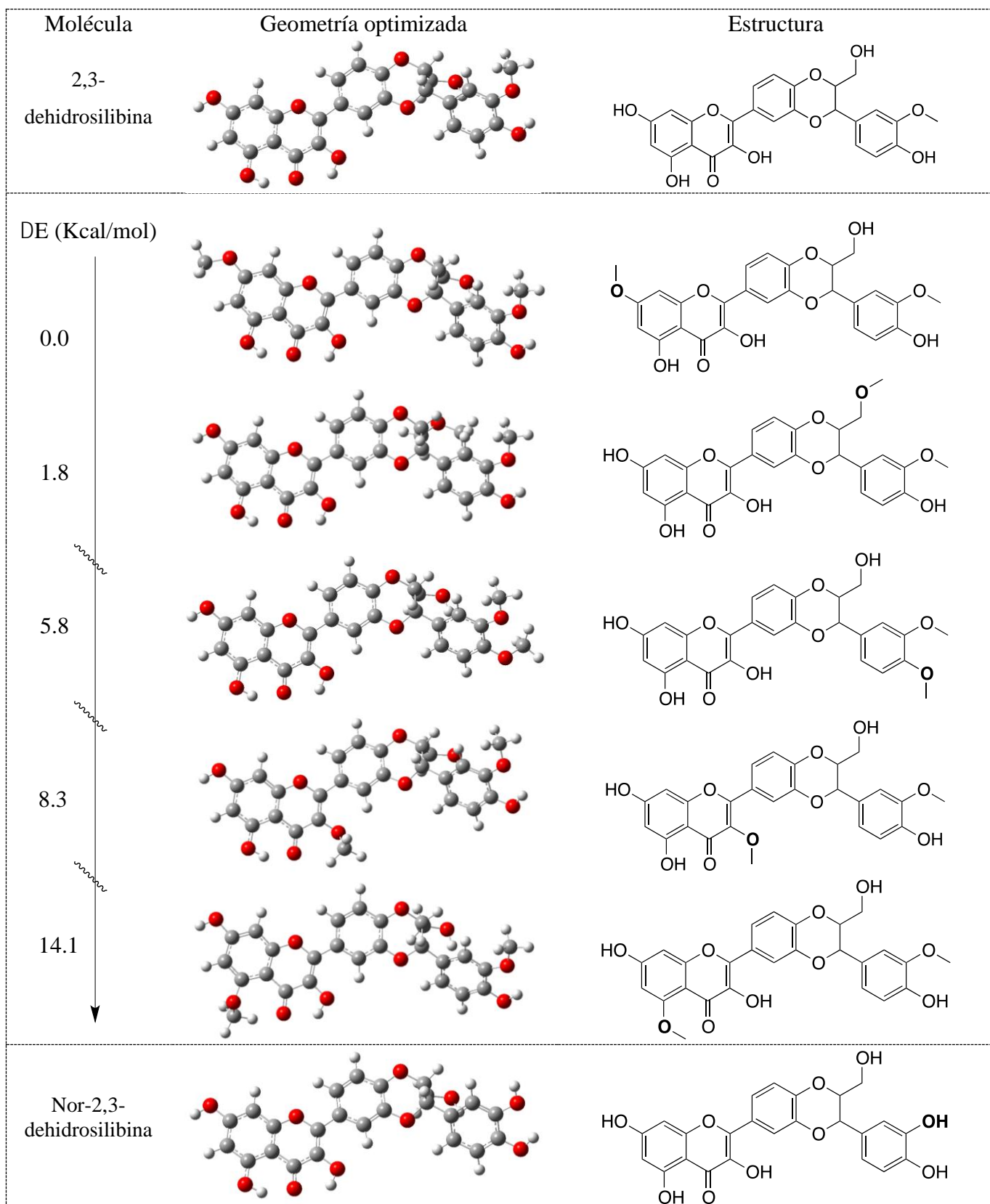


Figura 3. Representación molecular de las estructuras estudiadas y diferencia de energía entre distintos isómeros monometilados de la 2,3-dehidrosilibina.

Para la silibina y sus derivados, Figura 2, las estructuras con los grupos metoxi en posición R₃, R₇ y R₂₀ son similares a las antes reportadas⁴. Hay tres isómeros monometilados con estabilidad similar, con diferencias de energía menores a 5 Kcal/mol, por lo que podrían coexistir en un experimento. Dos de ellos presentan tres puentes de hidrógeno intramoleculares: grupos metilos en las posiciones R₇ y R₂₃ respectivamente ($\Delta E=1.8$ Kcal/mol), mientras que el tercer isómero tiene sólo dos puentes de hidrógeno por la presencia del grupo metilo en posición R₃ ($\Delta E=3.7$ Kcal/mol). Para los otros dos isómeros se observan mayores diferencias energéticas debido a la posición del grupo metilo: posiciones R₂₀ ($\Delta E=6.0$ Kcal/mol) y R₅ ($\Delta E=14.0$ Kcal/mol). Aparentemente, el puente de hidrógeno más importante para la estabilización de la molécula de silibina es aquel que se sitúa en posición R₅, seguido del que está en R₂₀ y por último el que se encuentra en R₃. El compuesto metilado en R₅ es de especial interés pues no se encuentra reportado en la bibliografía y demuestra la importancia del puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo -OH en R₅ y el grupo carbonilo.

En la Figura 2 se presenta también la estructura de la nor-silibina, compuesto sin grupos metoxi y de gran interés pues se puede, por comparación, estudiar el papel de los grupos -OH en términos de la capacidad antirradicálica.

El análisis conformacional de las moléculas silibina, 2,3-dehidrosilibina y sus derivados monometilados ya se encuentra reportado en la bibliografía⁴. Se destaca la importancia de los puentes de hidrógeno y su relevancia en la estabilización de las moléculas estudiadas. En este trabajo se añade el análisis cuantitativo de la influencia de los puentes de hidrógeno intramoleculares en términos de la estabilidad de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina. En las Figuras 4 y 5 se reportan esquemas con las moléculas que contienen diferentes puentes de hidrógeno intramoleculares. Se reporta también la diferencia de la energía entre ellas, con respecto a la más estable.

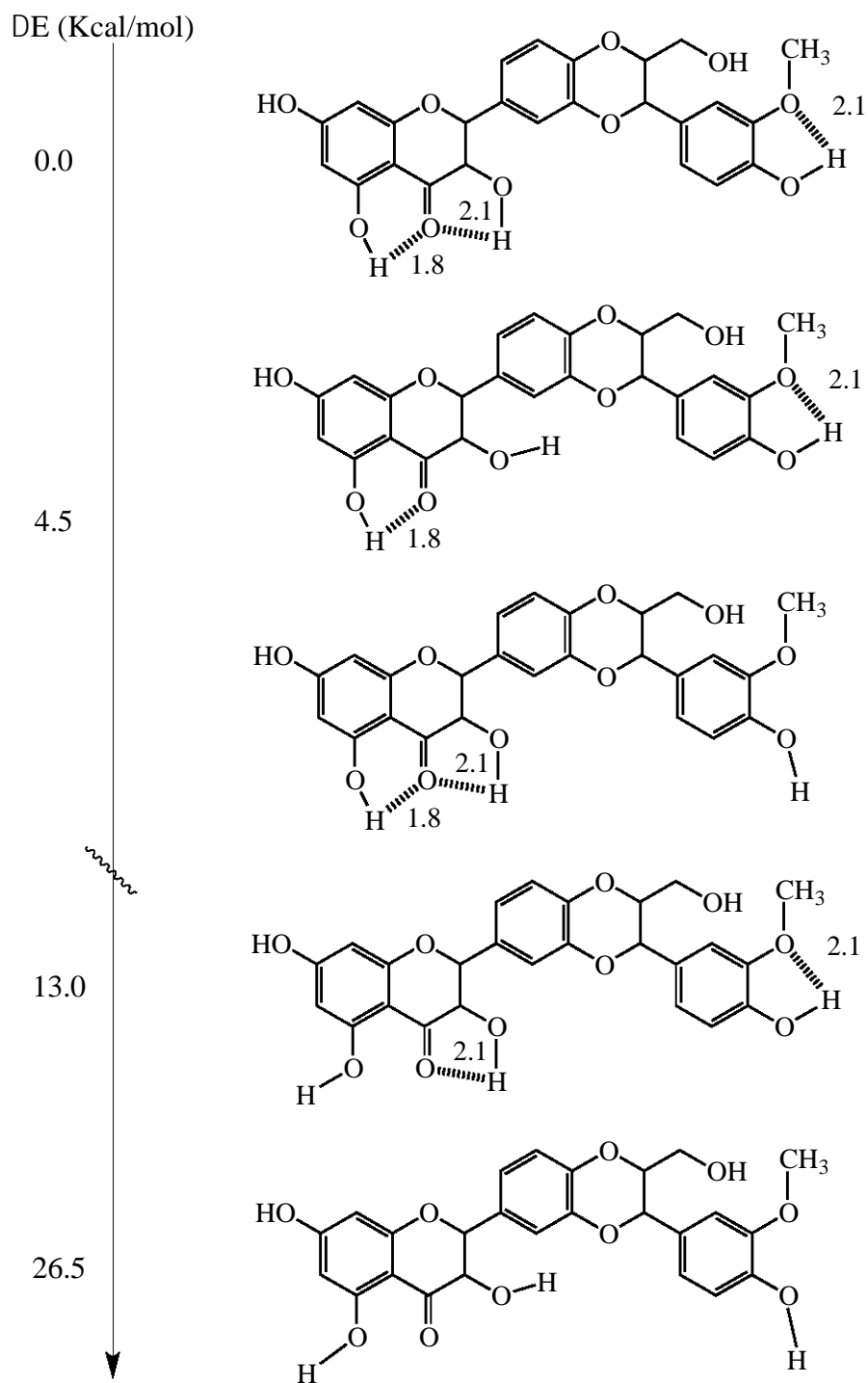


Figura 4. Representación esquemática de la silibina indicando las distancias en los puentes de hidrógeno (Å).

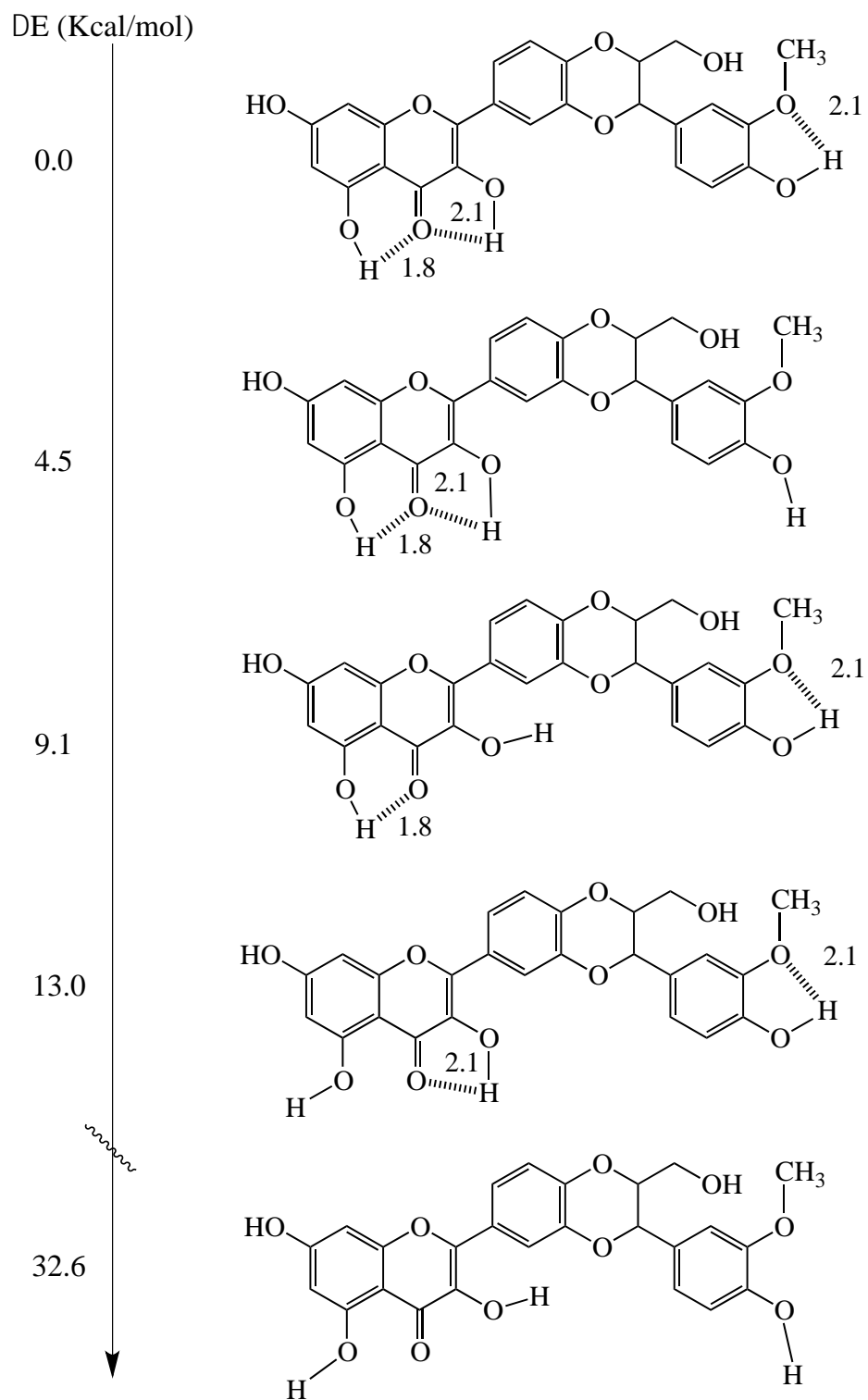


Figura 5. Representación esquemática de la 2,3-dehidrosilibina indicando las distancias en los puentes de hidrógeno (Å).

Para ambas moléculas, la estructura más estable es aquella que presenta tres puentes de hidrógeno y la menos estable aquella en la que no hay ningún puente de hidrógeno.

Para la silibina, Figura 4, hay además de la estructura más estable, otras dos que podrían coexistir en un experimento ($\Delta E=4.5$ Kcal/mol). Estas dos estructuras tienen dos puentes de hidrógeno intramoleculares, uno situado entre el H en posición R_5 y el O del carbonilo, y los otros entre el H en posición R_{20} y el O del grupo metoxi en R_{19} , y entre el H en R_3 y el O del carbonilo respectivamente. La estructura donde se gira el grupo $-OH$ en posición R_5 pero mantiene dos puentes de hidrógeno es menos estable ($\Delta E=13.0$ Kcal/mol), lo cual indica la importancia para la estabilidad que representa el puente de hidrógeno en R_5 .

Para la 2,3-dehidrosilibina, Figura 5, se observa que para las dos estructuras con dos puentes de hidrógeno, uno de ellos en R_5 , hay diferencias de estabilidad notables. La estructura con el puente de hidrógeno entre el H en R_3 y el O del carbonilo ($\Delta E=4.5$ Kcal/mol) es mucho más estable que aquella en la que el segundo puente de hidrógeno se encuentra entre el H en R_{20} y el O del metoxi en R_{19} ($\Delta E=9.1$ Kcal/mol). Esto se debe a la diferencia estructural entre la silibina y la 2,3-dehidrosilibina. El doble enlace en la posición C2-C3 de la 2,3-dehidrosilibina provoca estas diferencias energéticas. El puente de hidrógeno en posición R_3 que interactúa con el grupo carbonilo cobra una importancia particular. Cuando se gira ese puente de hidrógeno se rompe la planaridad de la molécula. El ángulo diedro pasa de 175° a 140° . Esta distorsión provoca una eficiencia menor en la deslocalización electrónica entre los anillos A, C, B y D y por lo tanto un aumento en la energía. El puente de hidrógeno R_3 en la 2,3-dehidrosilibina es el segundo más importante, mientras que en la silibina, al no existir ese doble enlace en los carbonos C2 y C3, el giro del grupo $-OH$ en R_3 es una situación energética menos importante.

Esta información no sólo corrobora la importancia de los puentes de hidrógeno en ambas moléculas. También es relevante si se quiere estudiar la interacción de silibina y 2,3-dehidrosilibina con cúmulos metálicos⁵.

○ ESPECTROS RAMAN Y UV-VISIBLE

La caracterización estructural por medio de la obtención de los espectros teóricos Raman y los máximos de absorción del espectro UV-visible de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina, sus derivados monometilados más estables, la nor-silibina y la nor-2,3-dehidrosilibina, se presenta a continuación.

En la Figura 6 se muestran los espectros Raman de la silibina y de la 2,3-dehidrosilibina teóricos en donde se aprecian diferencias importantes indicadas con estrellas (*). Estas diferencias indican que es posible detectar la oxidación de silibina a 2,3-dehidrosilibina por espectroscopia Raman. Estos espectros teóricos pueden servir de referencia para futuros experimentos.

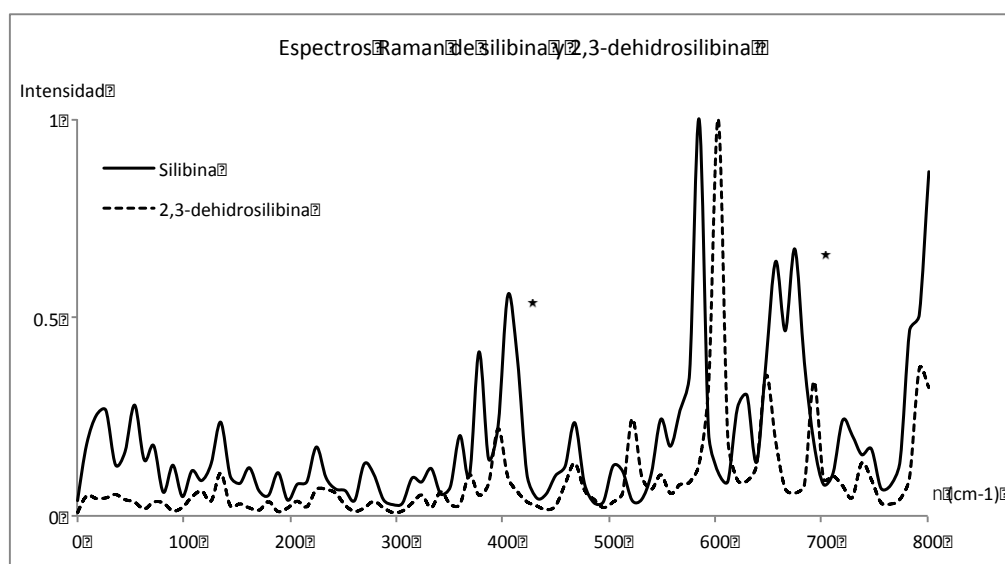


Figura 6. Espectros Raman teóricos para la silibina y sus estructuras derivadas.

En las Figuras 7 y 8 se presentan los espectros Raman de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina, sus derivados monometilados más estables y la molécula sin grupos metoxi respectivamente. El punto más importante de estos espectros es la presencia de los grupos –OCH₃ en los derivados monometilados de silibina y de 2,3-dehidrosilibina.

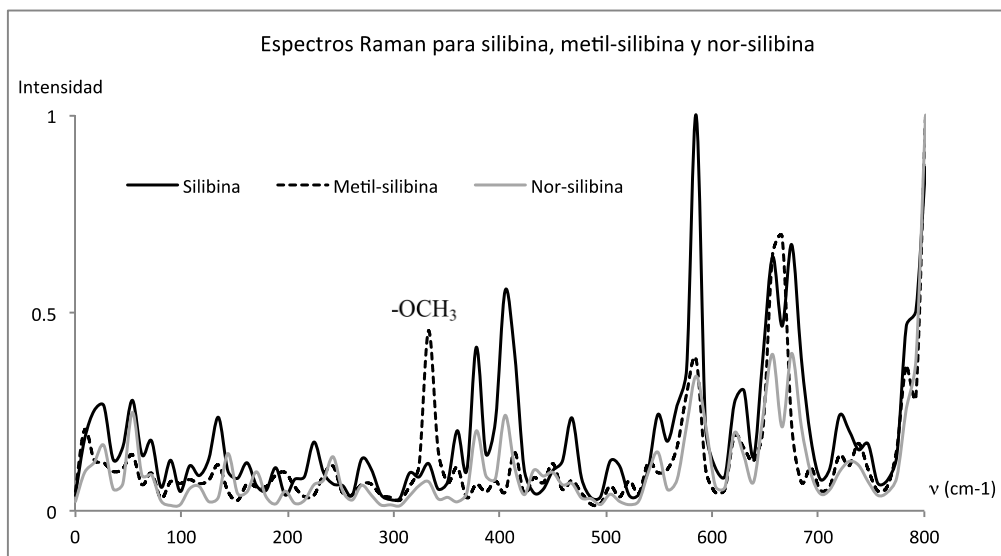


Figura 7. Espectros Raman teóricos para la silibina y sus estructuras derivadas.

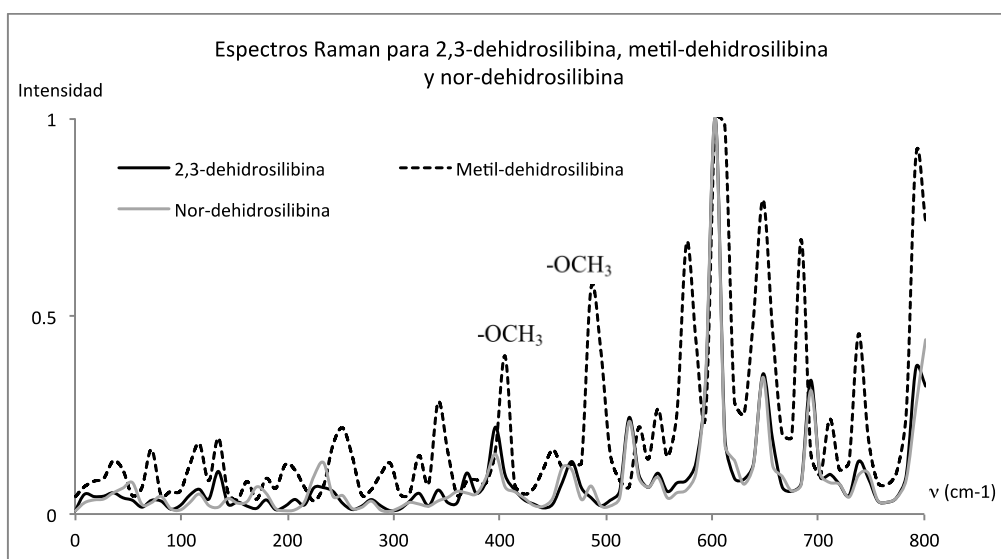


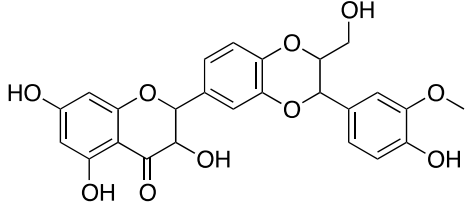
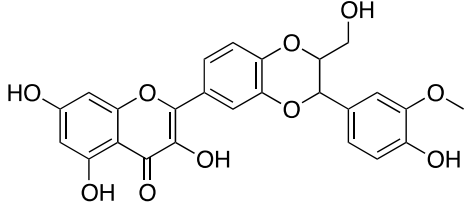
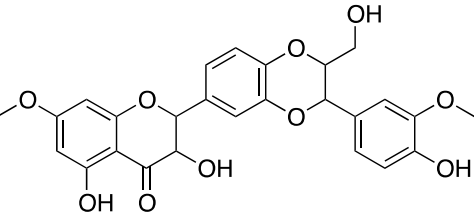
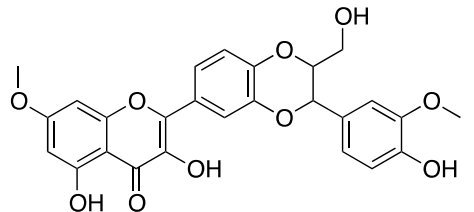
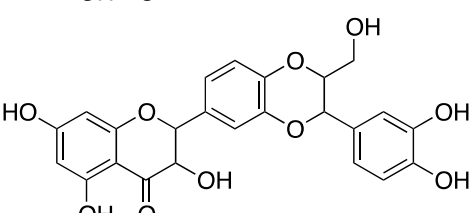
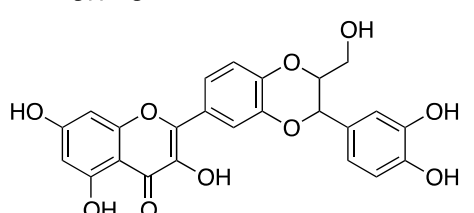
Figura 8. Espectros Raman teóricos para la 2,3-dehidrosilibina y sus estructuras derivadas.

La conclusión más importante de estos espectros es que se puede seguir por espectroscopia Raman la oxidación de silibina a 2,3-dehidrosilibina.

En la Tabla 1 se presentan las longitudes de onda de los máximos de absorción de los espectros teóricos de UV-visible. Para los compuestos con el doble enlace en la posición C2-C3 los máximos de absorción se ven desplazados a valores mayores de longitud de onda.

Los máximos de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$, permiten diferenciar entre la silibina y la 2,3-dehidrosilibina, lo que posibilita el seguimiento de la oxidación de silibina en su derivado deshidrogenado mediante esta técnica. Estos espectros pueden servir de referencia para futuros experimentos.

Tabla 1. Máximos de absorción en los espectros teóricos de UV-visible para las estructuras estudiadas.

Silibina y sus derivados	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	2,3-dehidrosilibina y sus derivados	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	269		362
	274		365
	270		362

En el Apéndice C se llevó a cabo una comparación de los espectros teóricos de UV-visible y de los máximos de absorción para la molécula de silibina empleando dos diferentes metodologías.

○ CAPACIDAD DE SILIBINA, 2,3-DEHIDROSILIBINA Y SUS DERIVADOS PARA ATRAPAR
RADICALES LIBRES

Uno de los principales aspectos del estudio de la silibina y sus derivados es investigar por distintos mecanismos de transferencia qué tan buena es su capacidad para atrapar radicales libres. Para este trabajo se reporta el estudio de los mecanismos de transferencia electrónica y de formación de aductos como función del pH. En el Apéndice B se reporta de igual manera el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno para las moléculas de silibina y 2,3-dehidrosilibina.

En el mecanismo de transferencia electrónica se analiza, a partir de los parámetros electrónicos de energía de ionización y afinidad electrónica verticales, qué tan fácilmente una especie puede ceder o aceptar electrones con el propósito de estabilizar un radical libre. Se empleó la herramienta gráfica del FEDAM (*Full Electron Donor-Acceptor Map*)^{6,7} que resulta muy útil por la visualización de los diferentes fenómenos de donación-aceptación de electrones.

En el mecanismo de formación de aductos se estudió qué tan favorecida termodinámicamente se encuentra la disociación del radical libre $\bullet\text{OOH}$ de las moléculas de estudio.

● DESPROTONACIÓN DE SILIBINA, 2,3-DEHIDROSILIBINA Y SUS
DERIVADOS

El aspecto más importante y original del estudio de los derivados de silibina y 2,3-dehidrosilibina presentado en este trabajo es la modelización de las especies presentes a pH fisiológico que se apoya en resultados experimentales previos^{8,9}.

A pH = 7.4 no todas las especies se encuentran sin desprotonar, por lo que tener en cuenta esta variable podría ser interesante en la posible actividad antirradicálica.

En la Tabla 2 se presenta la abundancia relativa de las especies estudiadas. A pH=7.4, existe 69.08% de silibina sin desprotonar, pero sólo 6.92% de 2,3-dehidrosilibina. En cambio a pH=7.4, hay 61.51% de 2,3-dehidrosilibina desprotonada. Este estudio cobra

especial interés cuando se trata de identificar la capacidad antirradicálica de los derivados de silibina y de 2,3-dehidrosilibina a pH fisiológico.

Tabla 2. Abundancias relativas de las especies estudiadas a pH=7.4.

Molécula	Abundancia relativa a pH = 7.4 (en %)
Silibina	69.08
Silibina ⁻	26.30
Silibina ²⁻	0.31
Metil-silibina	93.31
Metil-silibina ⁻	6.37
Metil-silibina ²⁻	0.02
Nor-silibina	69.24
Nor-silibina ⁻	25.98
Nor-silibina ²⁻	0.31
2,3-dehidrosilibina	6.92
2,3-dehidrosilibina ⁻	61.51
2,3-dehidrosilibina ²⁻	18.89
2,3-dehidrosilibina ³⁻	0.15
Metil-dehidrosilibina	35.35
Metil-dehidrosilibina ⁻	61.47
Metil-dehidrosilibina ²⁻	1.08
Nor-dehidrosilibina	6.84
Nor-dehidrosilibina ⁻	60.76
Nor-dehidrosilibina ²⁻	18.66
Nor-dehidrosilibina ³⁻	0.15

- MECANISMO DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA

En las Figuras 9 y 10, se presentan los mapas donador-aceptor para los sistemas estudiados como función del pH (pH=7.4); se incluyen tres radicales libres DPPH•, •OOH y NO₂• y las moléculas de astaxantina (Asta) y resveratrol (Resve) conocidas por su buena capacidad antirradicálica. Se utilizaron los disolventes agua y DMSO para modelar un medio polar y no polar, respectivamente.

Del mapa donador-aceptor se puede afirmar que la 2,3-dehidrosilibina y sus derivados son mejores donadores y aceptores que la silibina y sus derivados. Esto se debe a que tienen menores valores de energía de ionización y mayores valores de afinidad electrónica.

Ninguno de los sistemas estudiados en estado neutro puede donar o aceptar electrones para estabilizar el DPPH•, sin embargo sí puede existir la estabilización de los radicales libres •OOH y NO₂• por el mecanismo de donación de electrones.

Si se toman en cuenta las especies desprotonadas (Sily(-), DeSily(-) y DeSily(2-)), se aprecia que éstas son mejores donadoras y peoresceptoras de electrones que las no desprotonadas, y que la 2,3-dehidrosilibina y sus derivados desprotonados son mejores donadores que aquellos de silibina desprotonados. Este hecho tiene consecuencias importantes en la capacidad antirradicálica pues las especies desprotonadas de la 2,3-dehidrosilibina son capaces de donar electrones al radical libre DPPH• para estabilizarlo. Este fenómeno es importante porque en condiciones fisiológicas, la 2,3-dehidrosilibina se encontrará desprotonada, por lo que su capacidad para donar y aceptar electrones se incrementa significativamente y por lo tanto su capacidad antirradicálica.

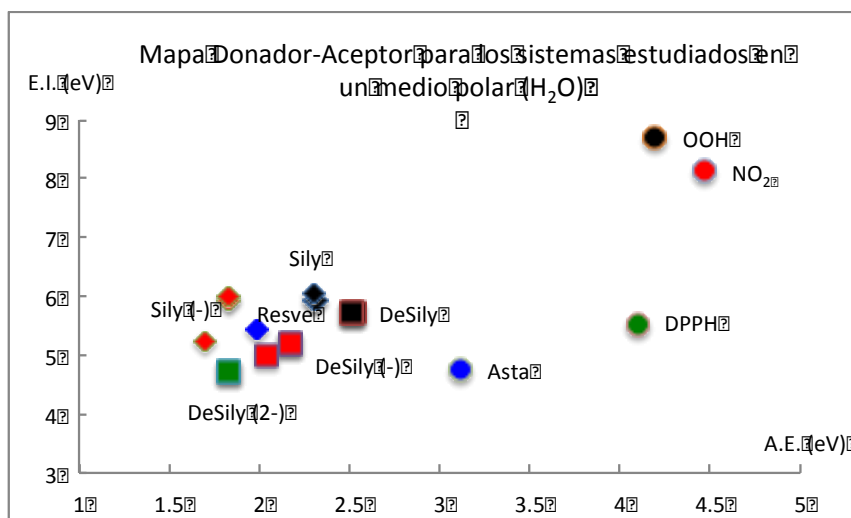


Figura 9. Mapa donador-aceptor para los sistemas estudiados en un medio polar (H₂O).

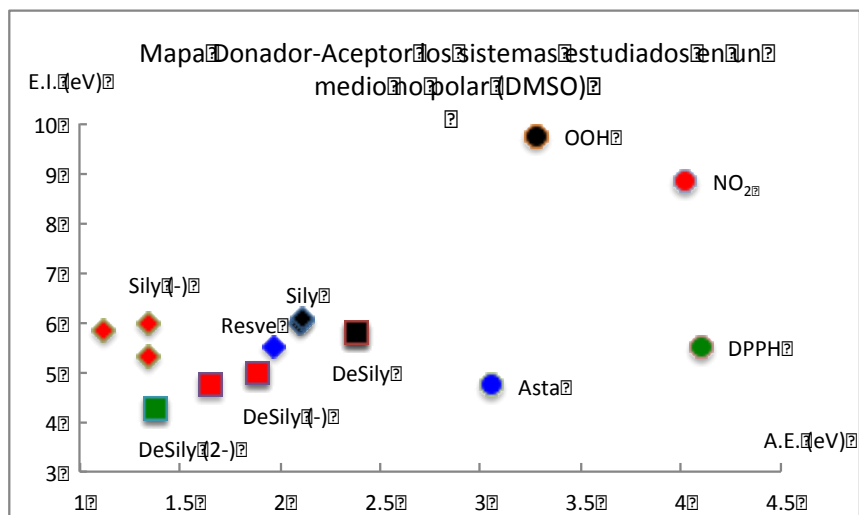


Figura 10. Mapa donador-aceptor para los sistemas estudiados en un medio no polar (DMSO).

- MECANISMO DE FORMACIÓN DE ADUCTOS

De la bibliografía se sabe que la silibina es menos efectiva para estabilizar el radical libre superóxido ($\bullet\text{OOH}$) que la 2,3-dehidrosilibina⁴. Considerando que el mecanismo de transferencia electrónica sólo explica parcialmente este fenómeno es necesario buscar otras posibilidades. Para ello se estudió la formación de aductos con el radical libre $\bullet\text{OOH}$ y las moléculas silibina, 2,3-dehidrosilibina y nor-2,3-dehidrosilibina, estas últimas dos tomando en cuenta las especies desprotonadas que existen a pH fisiológico. Se añadió el radical libre $\bullet\text{OOH}$ a cada doble enlace C-C y a los átomos que participan en puentes de hidrógeno. En las Tablas 3 a 7 se presentan los valores de ΔE en Kcal/mol para la reacción de disociación del aducto. En cada esquema se encuentran numerados los átomos de carbono y oxígeno a los que se les añadió el radical libre superóxido, $\bullet\text{OOH}$.

Valores positivos de ΔE corresponden a situaciones energéticas favorecidas, es decir que la formación del aducto en un átomo específico es termodinámicamente más estable que su disociación. En este trabajo, a estos átomos se les nombrará como átomos reactivos y en las Tablas 3 a 7 se pueden distinguir por estar en negritas. Un valor mayor de ΔE indica un enlace más fuerte entre el radical libre $\bullet\text{OOH}$ y el átomo de la molécula orgánica.

Para todos los compuestos presentados, en los átomos O31 y O51, la adición del radical libre $\bullet\text{OOH}$ forma sistemas estables ($>8\text{Kcal/mol}$), y comparando estos dos átomos

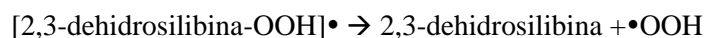
reactivos, O51 presenta valores más positivos que O31 por lo que la adición de $\bullet\text{OOH}$ se va a realizar preferentemente en ese átomo.

La silibina tiene nueve átomos reactivos con valores positivos de ΔE . El sitio reactivo más favorecido es en el átomo C10 con un valor de $\Delta E=11.7$ Kcal/mol. Por otro lado, la 2,3-dehidrosilibina tiene once átomos reactivos, siendo el átomo C2 el que forma el aducto más estable con el radical libre $\bullet\text{OOH}$, con un valor de $\Delta E=14.1$ Kcal/mol. Al analizar el sistema 2,3-dehidrosilibina desprotonado, la molécula presenta quince átomos reactivos. Los átomos C2, C3, C6 y O51 son aquellos donde los valores de ΔE son mayores, siendo C2 el más propicio para la formación del aducto, con un valor de $\Delta E=19.2$ Kcal/mol. Este estudio demuestra que la 2,3-dehidrosilibina y más precisamente la 2,3-dehidrosilibina desprotonada es más reactiva que la silibina para formar aductos con $\bullet\text{OOH}$. Además de tener más átomos reactivos también tiene valores de ΔE mayores. Esto se encuentra en congruencia con resultados previos que indican que la 2,3-dehidrosilibina es un mejor estabilizador de radicales libres⁴.

Tabla 3. Energías de disociación (Kcal/mol) correspondientes a la siguiente reacción:
 $[\text{Silibina-OOH}] \bullet \rightarrow \text{Silibina} + \bullet\text{OOH}$

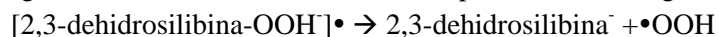
Silibina					
Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$
C4	-15.9	C11	0.5	C18	-1.6
C5	-5.3	C12	8.7	C19	7.7
C6	-1.7	C13	0.8	C20	6.8
C7	-6.4	C14	9.2	C21	-1.9
C8	-3.9	C15	-1.5	C22	-4.2
C9	-2.5	C16	-1.7	O31	8.4
C10	11.7	C17	-1.3	O51	8.2

Tabla 4. Energías de disociación (Kcal/mol) correspondientes a la siguiente reacción:



2,3-dehidrosilibina					
Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$
C2	14.1	C9	-6.2	C16	-3.0
C3	8.6	C10	-15.3	C17	-0.6
C4	10.7	C11	4.3	C18	-1.5
C5	-3.5	C12	-0.05	C19	2.7
C6	-0.1	C13	3.4	C20	1.6
C7	-4.5	C14	-8.7	C21	-1.9
C8	0.3	C15	1.8	C22	-4.4
O31	8.1	O51	12.7		

Tabla 5. Energías de disociación (Kcal/mol) correspondientes a la siguiente reacción:



2,3-dehidrosilibina ⁻					
Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$
C2	19.6	C9	2.7	C16	-0.3
C3	16.0	C10	-2.2	C17	-0.1
C4	7.3	C11	9.3	C18	-0.7
C5	1.0	C12	3.1	C19	3.3
C6	14.6	C13	8.4	C20	2.7
C7	-18.9	C14	-9.7	C21	-1.8
C8	11.0	C15	6.1	C22	-5.3
O31	10.2	O51	17.3		

En las Tablas 6 y 7 se presentan los resultados correspondientes al estudio de la nor-2,3-dehidrosilibina y la nor-2,3-dehidrosilibina desprotonada. Trabajos anteriores sugieren que el mejor sistema para estabilizar radicales libres es la nor-2,3-dehidrosilibina⁴.

Tabla 6. Energías de disociación (Kcal/mol) correspondientes a la siguiente reacción:
 $[\text{Nor-2,3-dehidrosilibina-OOH}]^\bullet \rightarrow \text{Nor-2,3-dehidrosilibina} + \bullet\text{OOH}$

Nor-2,3-dehidrosilibina					
Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$
C2	14.1	C9	-6.2	C16	-3.1
C3	8.5	C10	-15.4	C17	-1.2
C4	10.6	C11	4.3	C18	0.9
C5	-3.5	C12	-0.1	C19	2.0
C6	-0.2	C13	3.4	C20	0.8
C7	-4.6	C14	-8.8	C21	-1.6
C8	0.3	C15	1.8	C22	-4.6
O31	8.0	O51	12.6		

Tabla 7. Energías de disociación (Kcal/mol) correspondientes a la siguiente reacción:
 $[\text{Nor-2,3-dehidrosilibina-OOH}]^\bullet \rightarrow \text{Nor-2,3-dehidrosilibina}^- + \bullet\text{OOH}$

Nor-2,3-dehidrosilibina ⁻					
Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$	Átomo	$E_{\text{dis.}}$
C2	19.6	C9	2.7	C16	-0.3
C3	15.9	C10	-2.2	C17	-0.5
C4	7.2	C11	9.4	C18	1.9
C5	1.0	C12	3.0	C19	3.0
C6	14.6	C13	8.4	C20	1.9
C7	-19.0	C14	-9.7	C21	-1.7
C8	11.0	C15	6.1	C22	-5.5
O31	10.1	O51	17.2		

Comparando los resultados en las Tablas 4 y 5 correspondientes al estudio de formación de aductos para la 2,3-dehidrosilibina y la 2,3-dehidrosilibina⁻ con los de las Tablas 6 y 7, se

observa que la nor-2,3-dehidrosilibina y su análogo desprotonado tienen un átomo reactivo más que la 2,3-dehidrosilibina pero los valores de ΔE son muy parecidos.

La sustitución del grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$ por un grupo hidroxilo, $-\text{OH}$ (diferencias estructurales entre la 2,3-dehidrosilibina y la nor-2,3-dehidrosilibina) no parece afectar la capacidad antirradicálica de las moléculas para este mecanismo de formación de aducto. Esto no concuerda con los resultados experimentales que advierten sobre la mejor capacidad de la nor-2,3-dehidrosilibina para estabilizar radicales libres. Como se tiene reportado, quizá el mecanismo principal de transferencia por el cual la molécula de nor-2,3-dehidrosilibina actúa es la transferencia de átomo de hidrógeno⁴.

Como complemento a este estudio se llevó a cabo un análisis de los valores de las funciones de Fukui para el ataque radicálico de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina que se presenta en el Apéndice D.

○ CONCLUSIONES

Para la silibina y la 2,3-dehidrosilibina se encontró que la estructura más estable es aquella que presenta tres puentes de hidrógeno y que el puente de hidrógeno que estabiliza más los sistemas es aquel que se forma entre el hidroxilo, $-\text{OH}$, en R_5 del anillo A y el carbonilo, $\text{C}=\text{O}$, del anillo C.

Al comparar los espectros teóricos Raman de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina, se puede concluir que es posible detectar analíticamente la oxidación de silibina a 2,3-dehidrosilibina. De los espectros teóricos de UV-visible se observó que los máximos de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$, permiten diferenciar entre la silibina y su derivado deshidrogenado, la 2,3-dehidrosilibina.

Del mecanismo de transferencia electrónica y la construcción del mapa donador-aceptor de electrones se concluyó que la 2,3-dehidrosilibina es mejor aceptor y donador de electrones que la silibina y que ninguno puede estabilizar el radical $\text{DPPH}\cdot$. Sin embargo, al tomar en cuenta las especies desprotonadas de la 2,3-dehidrosilibina éstas sí pueden estabilizar el radical libre $\text{DPPH}\cdot$. Todos los sistemas estudiados estabilizan satisfactoriamente los

radicales libres $\bullet\text{OOH}$ y $\text{NO}_2\bullet$ pero ninguno mejora las propiedades de aceptar electrones de la astaxantina.

Para la formación de aductos con el radical libre $\bullet\text{OOH}$, los resultados muestran que la 2,3-dehidrosilibina tiene mayor capacidad para estabilizar este radical libre que la silibina, y que la 2,3-dehidrosilibina desprotonada es todavía una mejor opción para estabilizar $\bullet\text{OOH}$. Por otro lado, el estudio de este mecanismo no demuestra que la nor-2,3-dehidrosilibina y su análogo desprotonado sean mejores que la 2,3-dehidrosilibina para estabilizar al $\bullet\text{OOH}$.

Los resultados de esta sección se encuentran en el artículo publicado bajo el título *Silybin and 2,3-Dehydrosilybin flavonolignans as free radical scavengers* por los autores Miguel Reina y Ana Martínez en la revista *Journal of Physical Chemistry B*, volumen 119, páginas 11597-11606 en el año 2015.

2. INTERACCIÓN DE CÚMULOS DE CUATRO ÁTOMOS METÁLICOS CON SILIBINA

○ METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo, todos los cálculos fueron efectuados utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) y el código Gaussian09² en fase gas. Se utilizó el software Multiwfn para realizar un análisis topológico de la densidad electrónica a partir de la teoría de Bader de átomos en moléculas, para describir la interacción entre la silibina y los cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au por medio de un análisis de los puntos críticos de enlace.

Para modelar la interacción de cúmulos metálicos con silibina se seleccionó el funcional híbrido B3LYP y la base 6-31+G(d) para los átomos de H, C, O, y el pseudopotencial de Los Álamos LanL2DZ para los átomos metálicos Cu, Ag y Au. Se tiene reportado que este método computacional es adecuado para modelar este tipo de sistemas, ya que los orbitales híbridos y bases pequeñas describen adecuadamente moléculas orgánicas^[10-12]. Además, el pseudopotencial LanL2DZ se utiliza para los átomos metálicos y es adecuado pues toma en cuenta efectos relativistas^{13,14}. En cada caso, se llevó a cabo un análisis de frecuencias y se descartó la existencia de frecuencias imaginarias para corroborar que las geometrías obtenidas del cálculo correspondieran a un mínimo de energía y aseverar que la estructura obtenida fuera la más estable.

Se obtuvieron los espectros Raman al realizar un análisis de las frecuencias relacionado con los sistemas y los espectros de absorción UV-visible se calcularon mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad dependiente del tiempo con el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) LanL2DZ.

El mecanismo de transferencia electrónica implicó la obtención de las energías de ionización y afinidades electrónicas verticales de cada sistema. Para ello se partió de la estructura optimizada que fue mejorada con el mismo funcional híbrido B3LYP y con la base 6-311+G(d,p). A partir del resultado de la estructura neutra mejorada se calcularon las especies aniónicas y catiónicas considerando la geometría fija. Después se construyeron los distintos FEDAM que se presentan en este trabajo. Los efectos del disolvente se calcularon con el modelo de solvatación SMD³ con agua como disolvente polar.

○ OPTIMIZACIÓN DE GEOMETRÍAS DE LOS CÚMULOS

Antes de añadir los cúmulos a la molécula de silibina se revisaron los trabajos teóricos concernientes a la geometría y multiplicidad de cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au para conocer las geometrías más estables^{15,16,17}. Además, se probaron diferentes multiplicidades (1, 3 y 5) para los cúmulos de los tres metales.

Para todos los casos, las estructuras más estables fueron para los cúmulos como singuletes, $m=1$. En la Figura 11, se presentan las geometrías, las distancias (Å) y los ángulos de enlace para las estructuras de los cúmulos más estables.

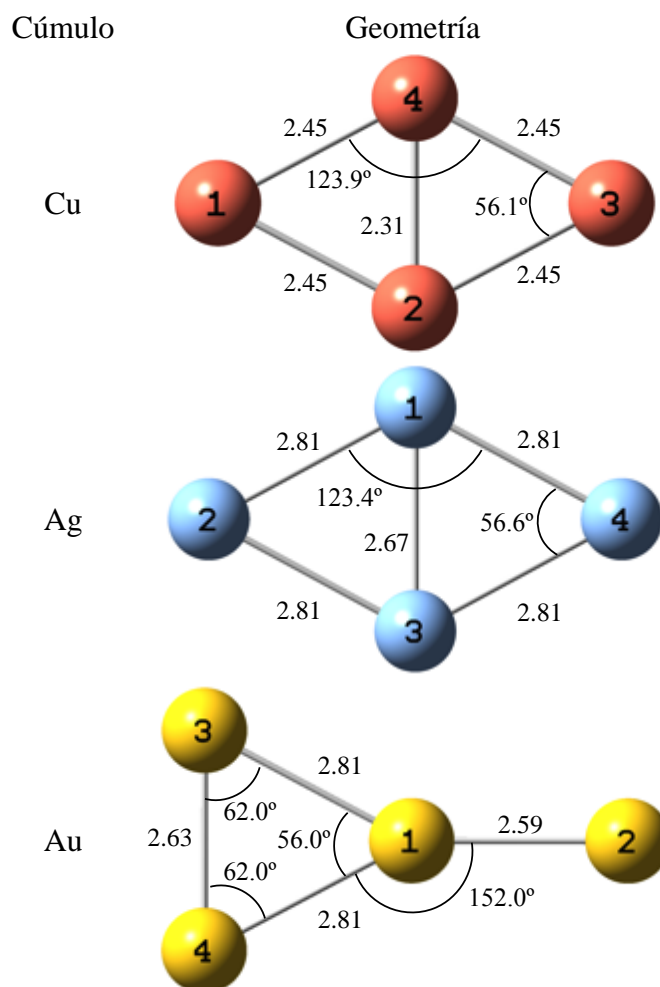


Figura 11. Geometrías optimizadas para los cúmulos de Cu, Ag y Au de cuatro átomos.

En el Apéndice F se puede encontrar el cálculo del cúmulo de Ag para las multiplicidades 1, 3 y 5 con el funcional M05-2X, con el fin de demostrar que sin importar el funcional utilizado, el orden de energía con respecto a la multiplicidad no cambia.

○ GEOMETRÍAS INICIALES DE ADICIÓN DE CÚMULOS METÁLICOS

Para evaluar los cambios en los espectros de caracterización: UV-visible y Raman se probaron sistemáticamente diferentes posiciones de interacción de los cúmulos metálicos en la silibina como se muestra en la Figura 12.

Las geometrías iniciales se separaron en tres categorías (1, 2 y 3). La categoría 1 se refiere a las interacciones de cúmulos de cuatro átomos (M_4) efectuadas verticalmente con respecto a los centroides de los anillos aromáticos A, B y E. La categoría 2 describe la interacción de los cúmulos en las posiciones quelatantes de la molécula de silibina: R_3 -CO, R_5 -CO y R_{19} - R_{20} . Por último, la categoría 3 representa la interacción de los cúmulos de forma separada, dos a dos (M_2), efectuada igualmente de manera vertical con respecto a los centroides de los anillos aromáticos A, B y E. Todos los sistemas de interacción se construyeron teniendo en cuenta la multiplicidad más favorable del cúmulo (singulete).

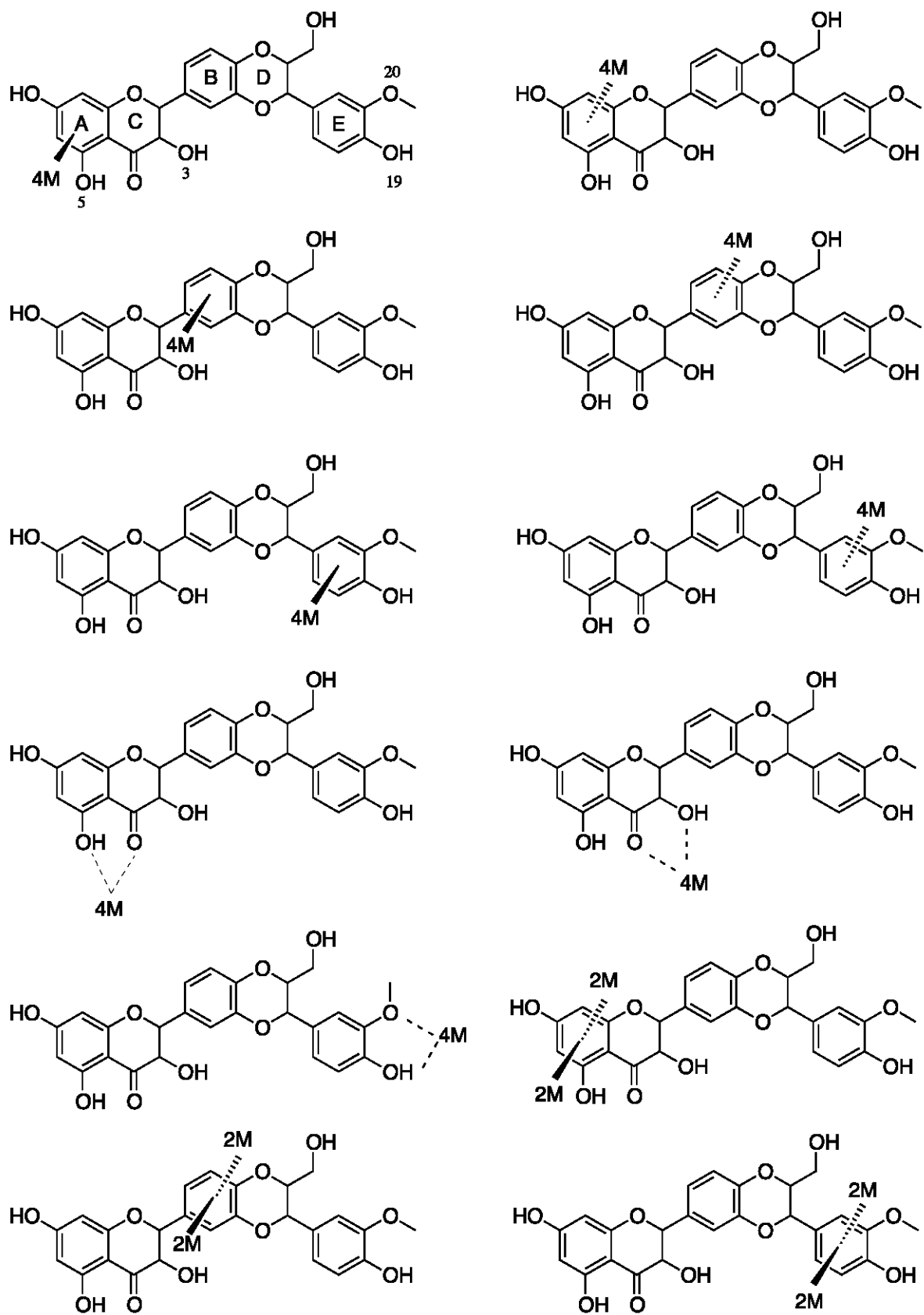


Figura 12. Figuras iniciales de interacción de los cúmulos metálicos a silibina.

○ INTERACCIÓN DE CÚMULOS DE CUATRO ÁTOMOS METÁLICOS CON SILIBINA

En la Figura 13 se muestra nuevamente la representación molecular de la silibina.

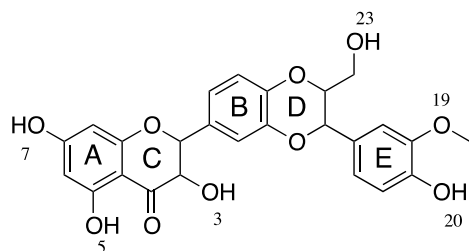


Figura 13. Representación molecular de la silibina.

En las Figuras 14, 15 y 16 se presentan las dos estructuras optimizadas más estables de los compuestos Silibina-Cu₄, Silibina-Ag₄, Silibina-Au₄. ΔE en kilocalorías por mol corresponde a las diferencias energéticas entre las estructuras comparadas y la más estable.

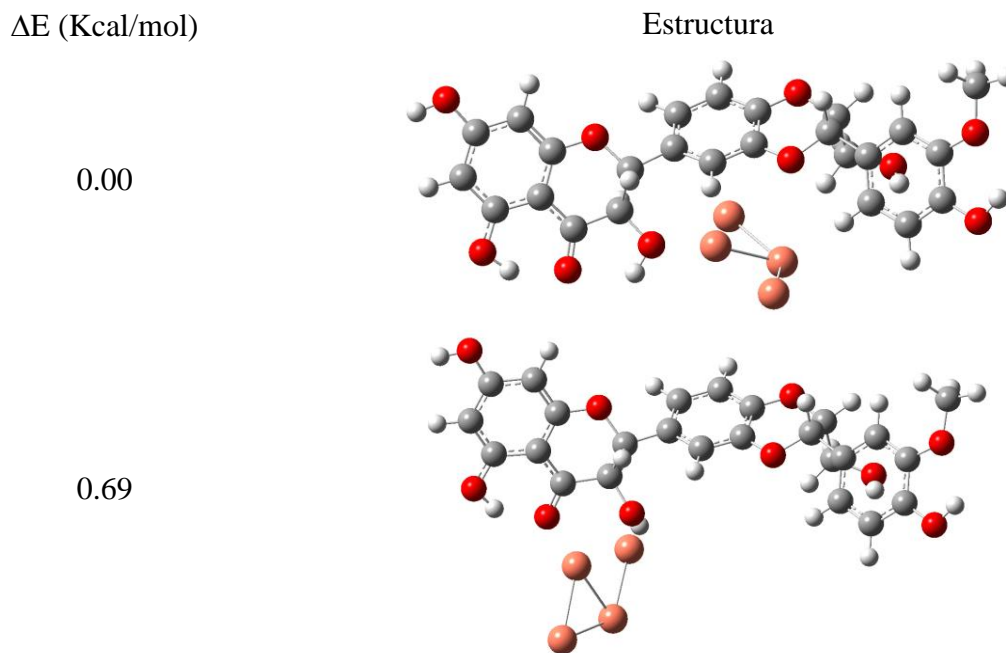


Figura 14. Estructuras optimizadas de Silibina-Cu₄.

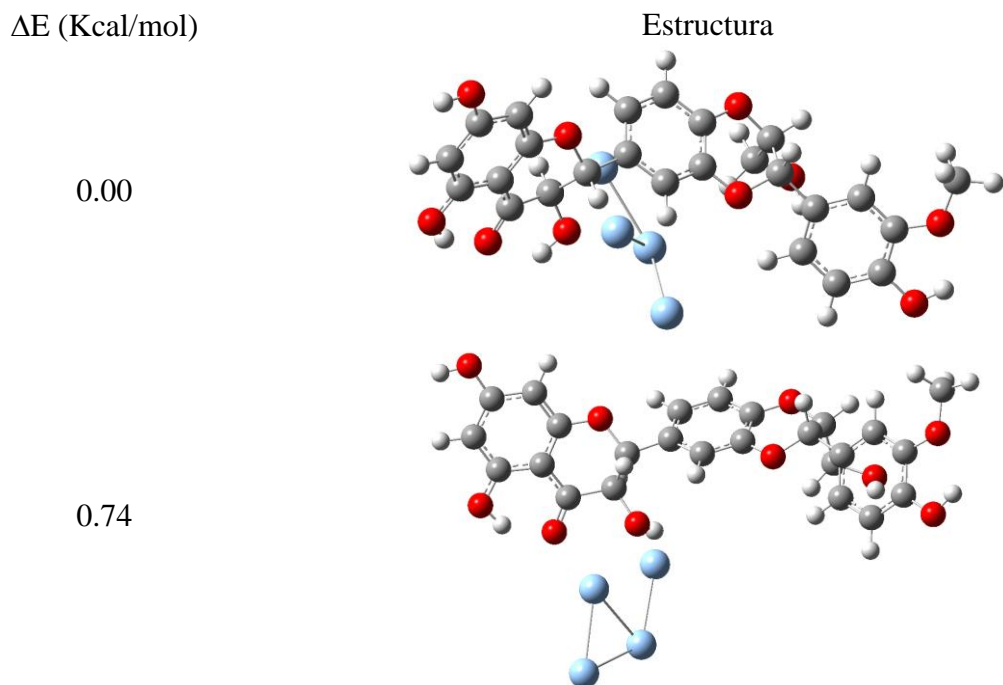


Figura 15. Estructuras optimizadas de Silibina-Ag₄.

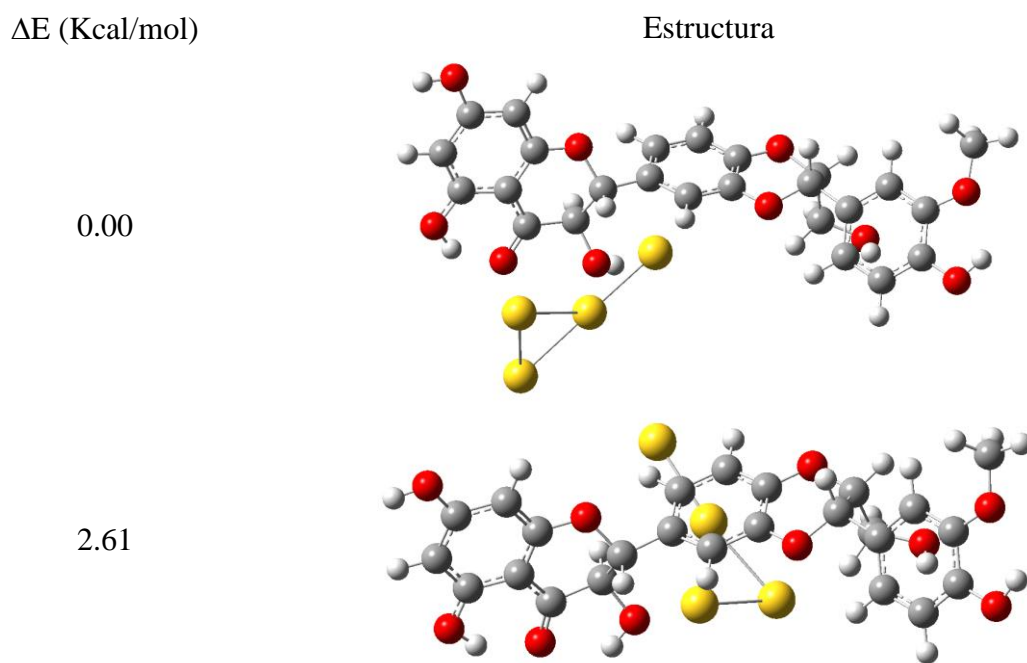


Figura 16. Estructuras optimizadas de Silibina-Au₄.

Los cúmulos interactúan en el anillo B de la silibina (anillo central de la molécula) y en la posición de adición R₃-CO. Los cúmulos de Cu, Ag y Au interactúan formando un quelato con una diferencia energética menor de 5 Kcal/mol con respecto al sistema más estable, por lo que ambos sistemas podrían coexistir en un experimento.

Para continuar el estudio detallado de la interacción de silibina con cúmulos metálicos se escogieron los sistemas de interacción del cúmulo en la posición R₃-CO. Se trata, en todos los casos, de estructuras estables con respecto al sistema más estable ($\Delta E=0.69$ Kcal/mol para Cu, $\Delta E=0.74$ Kcal/mol para Ag y $\Delta E=0.00$ Kcal/mol para Au) con la ventaja de que forman quelatos y desplazan los puentes de hidrógeno intramoleculares. Existe también el interés de analizar la competencia energética entre los puentes de hidrógeno y la interacción de los distintos cúmulos en ese sitio. Estos sistemas son Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄.

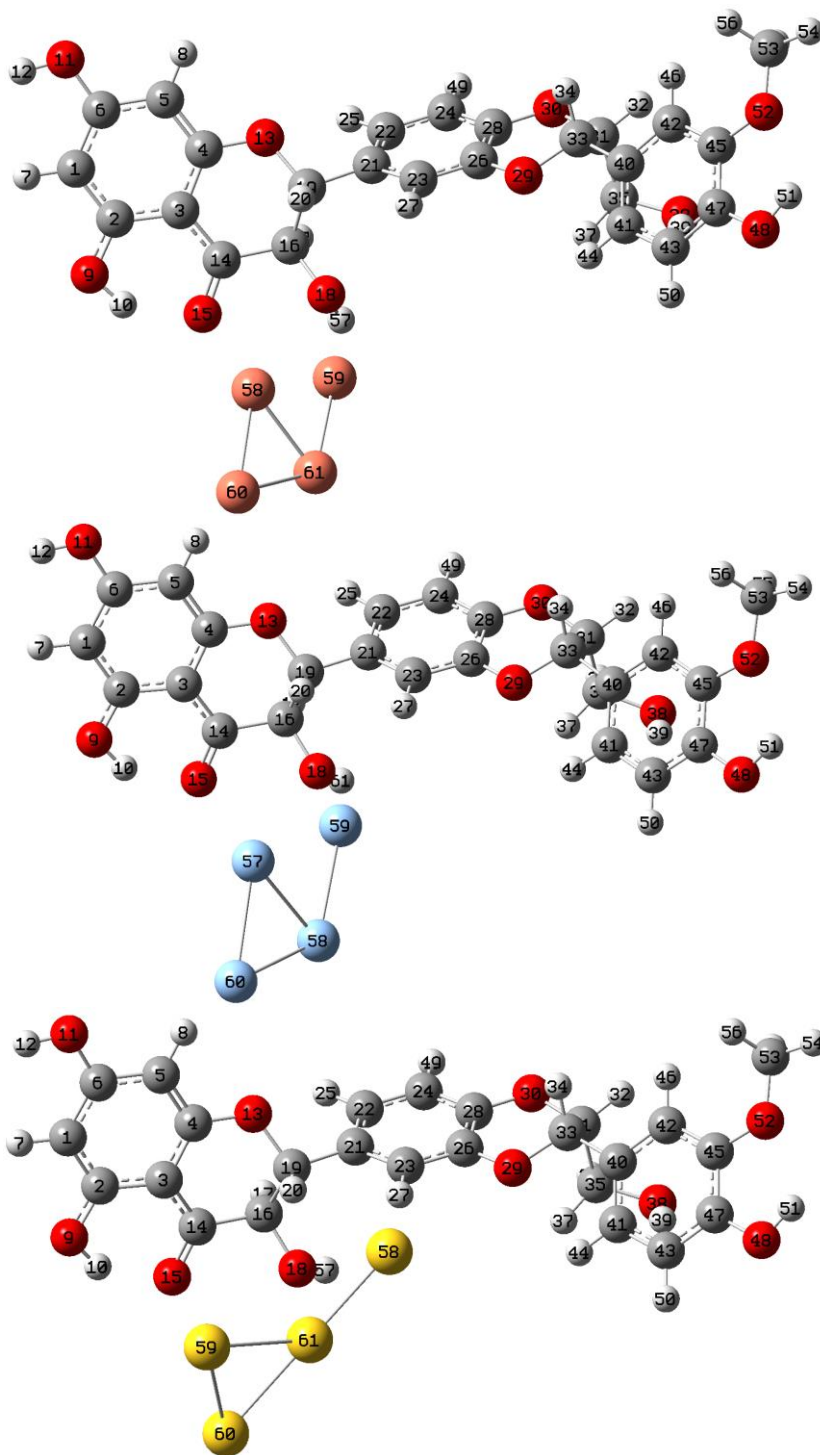
En el Apéndice G se puede encontrar una validación metodológica para el sistema [Sily-Cu₄] optimizado tomando en cuenta el disolvente y con el método SMD.

- DESCRIPCIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS CÚMULOS METÁLICOS Y LA SILIBINA
 - GEOMETRÍAS DE LAS ESTRUCTURAS Sily-Cu₄, Sily-Ag₄, Sily-Au₄

Para las geometrías Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄ se encuentran enlaces de puente de hidrógeno no convencionales¹⁸ entre el átomo de H del grupo hidroxilo, -OH, situado en R₃ y un átomo metálico. Esta interacción se produce debido a la inserción del cúmulo en la posición R₃-CO y el desplazamiento de H del grupo hidroxilo. Un primer átomo metálico interactúa directamente con los O del C=O y del -OH mientras que un segundo átomo metálico interactúa con el H del grupo -OH produciendo el puente de hidrógeno no convencional.

Para los cúmulos de los tres metales, las geometrías son similares, y en todas se encuentran las interacciones no convencionales M-H, que podrían tener un efecto estabilizador en los sistemas. En la Figura 17 se presentan de manera sucesiva las estructuras Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄ con las distancias más importantes Sily-M₄ y las cargas de Mulliken para los átomos involucrados en la interacción.

Estructura



Distancias (Å) Cargas de Mulliken

$$d_{O(15)-Cu(58)} = 2.02$$

$$d_{O(18)-Cu(58)} = 2.79$$

$$d_{H(57)-Cu(59)} = 2.45$$

$$Cu(58) = 0.100$$

$$Cu(59) = -0.178$$

$$Cu(60) = -0.010$$

$$Cu(61) = 0.168$$

$$O(15) = -0.605$$

$$O(18) = -0.453$$

$$H(57) = 0.485$$

$$d_{O(15)-Ag(57)} = 2.38$$

$$d_{O(18)-Ag(57)} = 2.81$$

$$d_{H(61)-Ag(59)} = 2.71$$

$$Ag(57) = 0.066$$

$$Ag(58) = 0.183$$

$$Ag(59) = -0.102$$

$$Ag(60) = -0.166$$

$$O(15) = -0.444$$

$$O(18) = -0.573$$

$$H(61) = 0.557$$

$$d_{O(15)-Au(59)} = 2.25$$

$$d_{O(18)-Au(59)} = 2.99$$

$$d_{H(57)-Au(58)} = 2.61$$

$$Au(58) = -0.366$$

$$Au(59) = 0.309$$

$$Au(60) = -0.283$$

$$Au(61) = -0.114$$

$$O(15) = -0.627$$

$$O(18) = -0.470$$

$$H(57) = 0.515$$

Figura 17. Análisis geométrico y de las cargas de Mulliken de las estructuras Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄.

Preguntarse cómo interactúan los cúmulos metálicos con la silibina es de suma importancia desde el punto de vista teórico y experimental. Para que haya una modificación en los espectros de caracterización se requiere que exista una interacción entre el cúmulo metálico y la silibina, sin embargo si esta interacción es de tipo enlazante, las propiedades electrónicas y, por lo tanto, una posible actividad biológica podrían cambiar radicalmente. Para analizar estos fenómenos se llevó a cabo un estudio geométrico y de las cargas de Mulliken del sistema, así como la construcción de mapas de potencial electrostático y contornos de densidad electrónica para evaluar cualitativamente si las propiedades electrónicas de la silibina se veían afectadas. También se realizó un análisis topológico de los sistemas.

En la Figura 17 se observa que todas las distancias reportadas son menores de 3\AA y por lo tanto pertenecen al intervalo correspondiente a interacciones fuertes¹⁹. El cúmulo metálico se encuentra cerca de la silibina. Las distancias M-H de los puentes de hidrógeno no convencionales no son en ningún caso las distancias más largas. Para todos los cúmulos se observa la misma tendencia con respecto a las distancias de interacción:

$$\text{distancia M-O}_{(\text{C=O})} < \text{distancia M-H} < \text{distancia M-O}_{(\text{OH})}$$

Para las cargas de Mulliken se observó que los átomos metálicos más cercanos a la silibina son Cu(58), Ag(57) y Au(59), todos ellos con carga positiva, mientras que los átomos de oxígeno son todos negativos; situación esperada en la interacción de metales con oxígeno. Además, debido a los valores tan pequeños, la interacción electrostática que se establece es débil. Los átomos del cúmulo metálico que participan en los puentes de hidrógeno no convencionales son Cu(59), Ag(59) y Au(58), todos con carga negativa, mientras que los átomos de hidrógeno presentan cargas positivas.

Con este primer análisis se puede concluir que los cúmulos se encuentran cerca e interactúan de manera electrostática con la silibina.

- MAPAS DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

Se construyó el mapa de potencial electrostático (MPE) para analizar cómo se distribuye la carga en el cúmulo y en sus alrededores y sobre todo, para evaluar si había cambios importantes en la molécula orgánica. La adición de los cúmulos podría modificar sensiblemente las propiedades de carga en la molécula de silibina y entonces afectar sus propiedades electrónicas. Como las propiedades electrónicas están estrechamente ligadas a la reactividad química y por lo tanto a la actividad biológica, un cambio en las primeras podría suponer, por ejemplo, la pérdida de la actividad biológica deseada.

Este estudio complementa el realizado sobre las cargas, pues ahora se analiza en el sistema desde un punto de vista global. Podemos observar los cambios de largo alcance producidos por la interacción de los distintos cúmulos metálicos con la silibina.

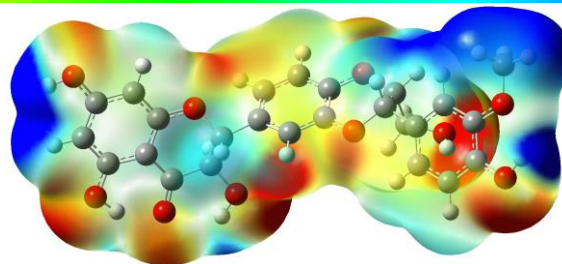
En la Figura 18 se muestran los MPE de Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄. Se observa que para todos los casos la distribución de carga en la molécula es prácticamente la misma que la que se encuentra en la silibina. Las tres zonas deficientes en electrones (regiones azules del mapa), que corresponden a los grupos hidroxilos en R₇ y en R₁₉ y al metoxi en R₂₀ no presentan mayores cambios cuando cualesquiera de los cúmulos metálicos interactúan con la silibina. Sucede lo mismo con las zonas ricas electrónicamente, los grupos hidroxilos en posiciones R₅ y R₂₃ permanecen invariantes con la interacción de los cúmulos. Sin embargo, se aprecia que el anillo C se empobrece ligeramente al tiempo que el átomo de oxígeno situado en R₃ se enriquece electrónicamente debido fundamentalmente a la presencia de los cúmulos.

Se puede concluir que la adición de los cúmulos altera el ambiente electrónico en la vecindad de la interacción, pero no modifica significativamente las relaciones de carga de la molécula de largo alcance. Este resultado podría interpretarse como positivo porque las propiedades electrónicas y por lo tanto químicas y de reactividad de la molécula de silibina no parecen variar con la interacción de los cúmulos en la silibina.

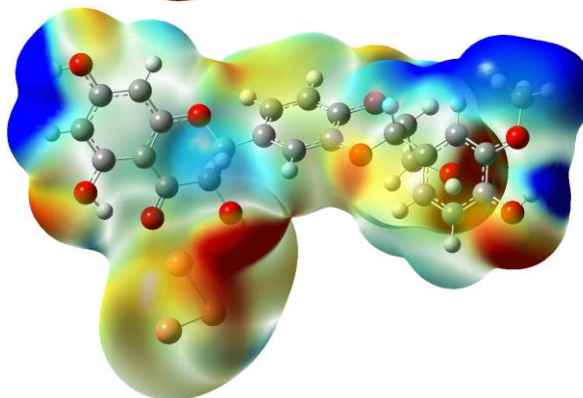
Escala



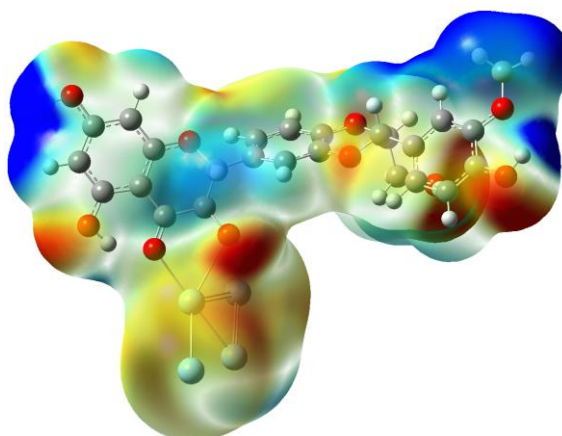
Silibina



Sily-Cu₄



Sily-Ag₄



Sily-Au₄

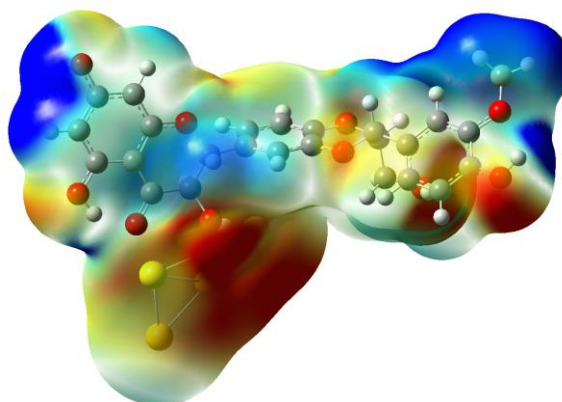


Figura 18. Mapas de potencial electrostático (MPE) de silibina y de Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄.

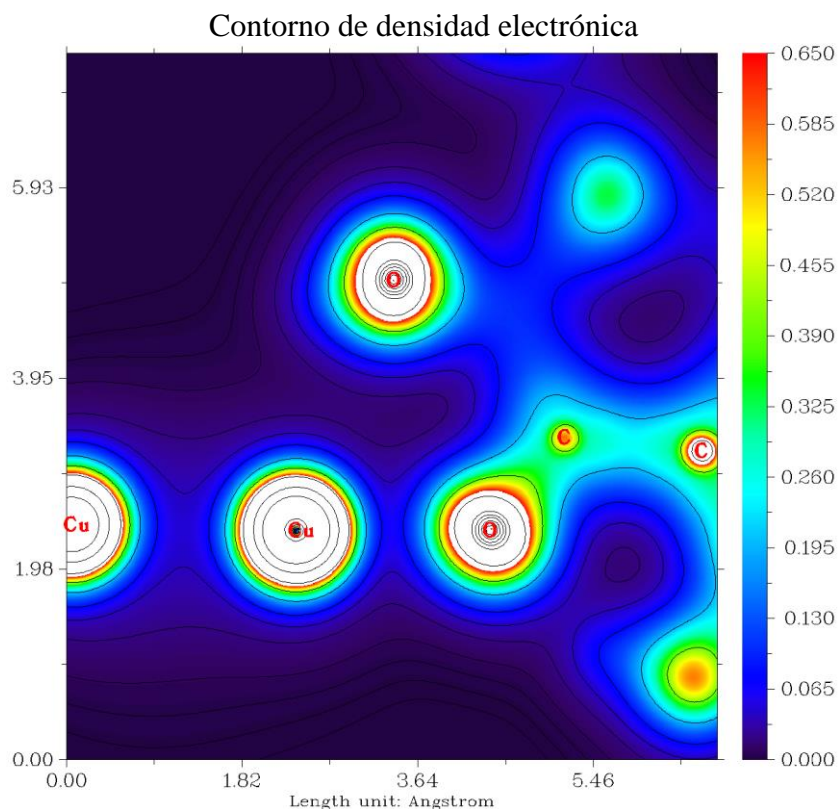
- CONTORNOS DE DENSIDAD

Como parte del estudio de la interacción de los cúmulos metálicos con la silibina, se obtuvieron los contornos de densidad. En la Figura 19 se presentan los contornos de densidad electrónica para los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄. Estos contornos muestran que existe densidad electrónica compartida entre el átomo de O del C=O y el átomo metálico más próximo, Cu(58), Ag(57) y Au(59). Podría existir también cierto porcentaje de carácter covalente en la interacción Sily-M₄ que antes se definió como una interacción electrostática.

De los tres sistemas estudiados, los cúmulos de Cu y Au son aquellos que muestran mayor compartición de densidad electrónica. Para estos dos casos el carácter covalente de la interacción sería mayor.

Estructura

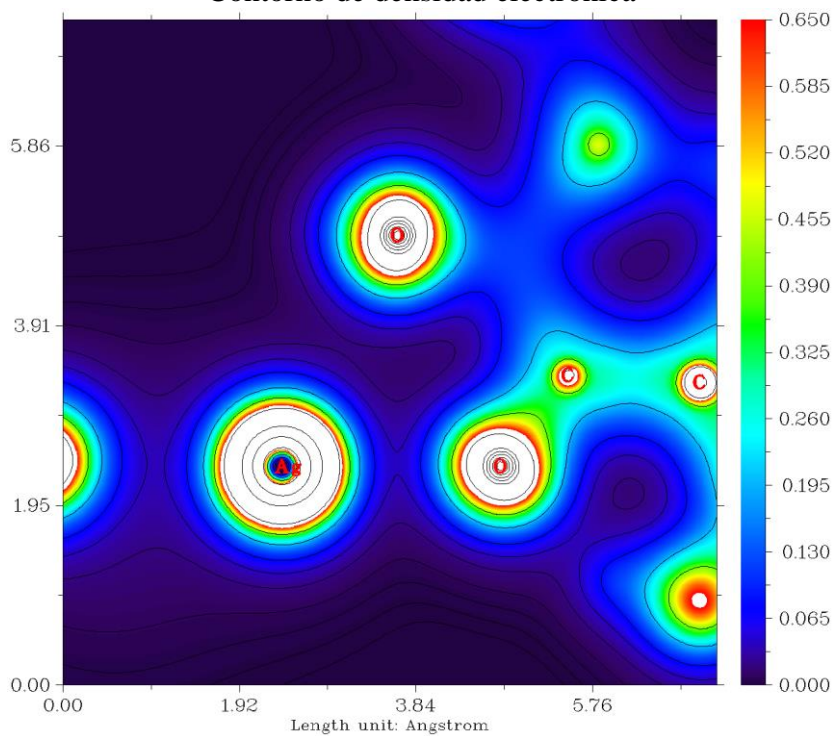
Sily-Cu₄



Estructura

Contorno de densidad electrónica

Sily-Ag₄



Sily-Au₄

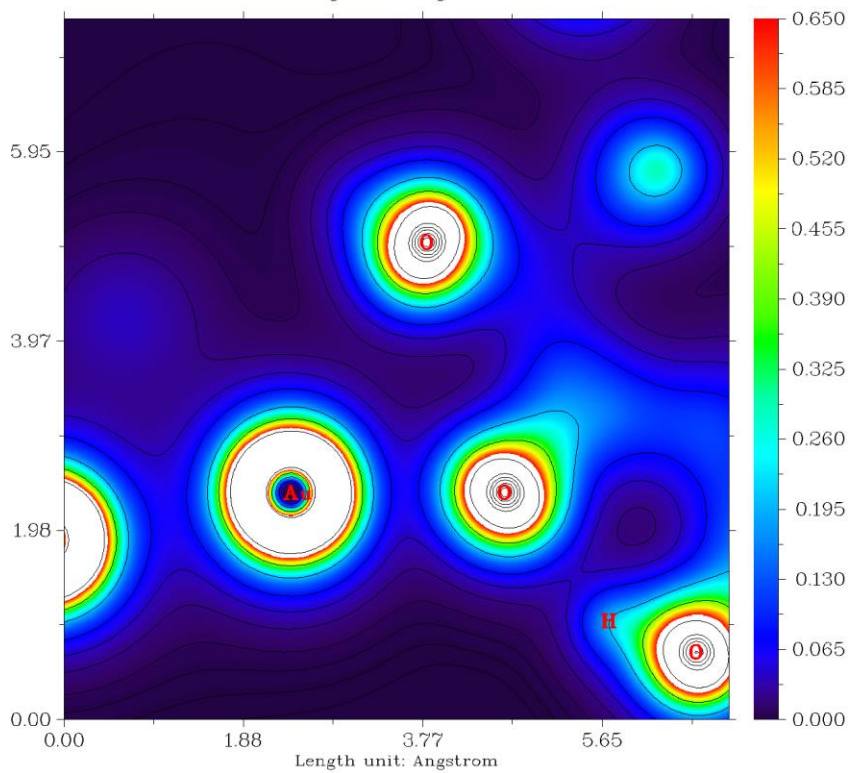


Figura 19. Contornos de densidad electrónica Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄.

- ANÁLISIS TOPOLÓGICO

En las Figuras 20, 21 y 22 se presentan los resultados del análisis topológico para las estructuras Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄, mientras que en la Tabla 8 se presentan los valores del Laplaciano de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho$, para los puntos críticos de enlace entre el oxígeno, O15 y los diferentes metales, Cu(58), Ag(57) y Au (59).

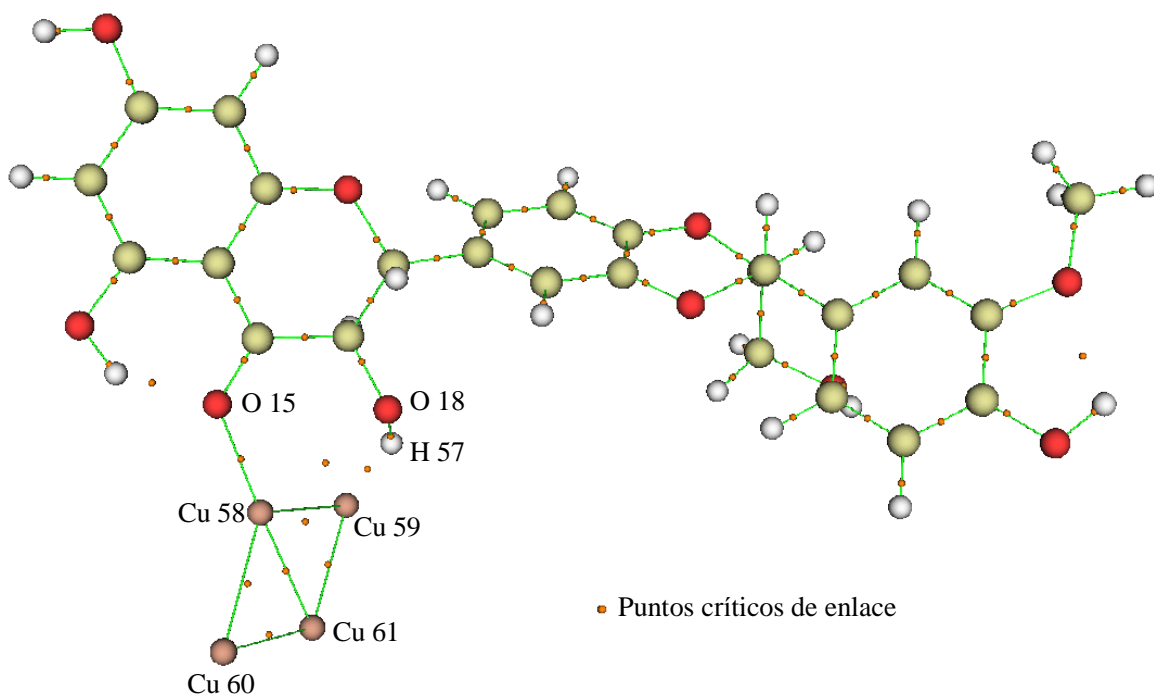


Figura 20. Análisis topológico para Sily-Cu₄.

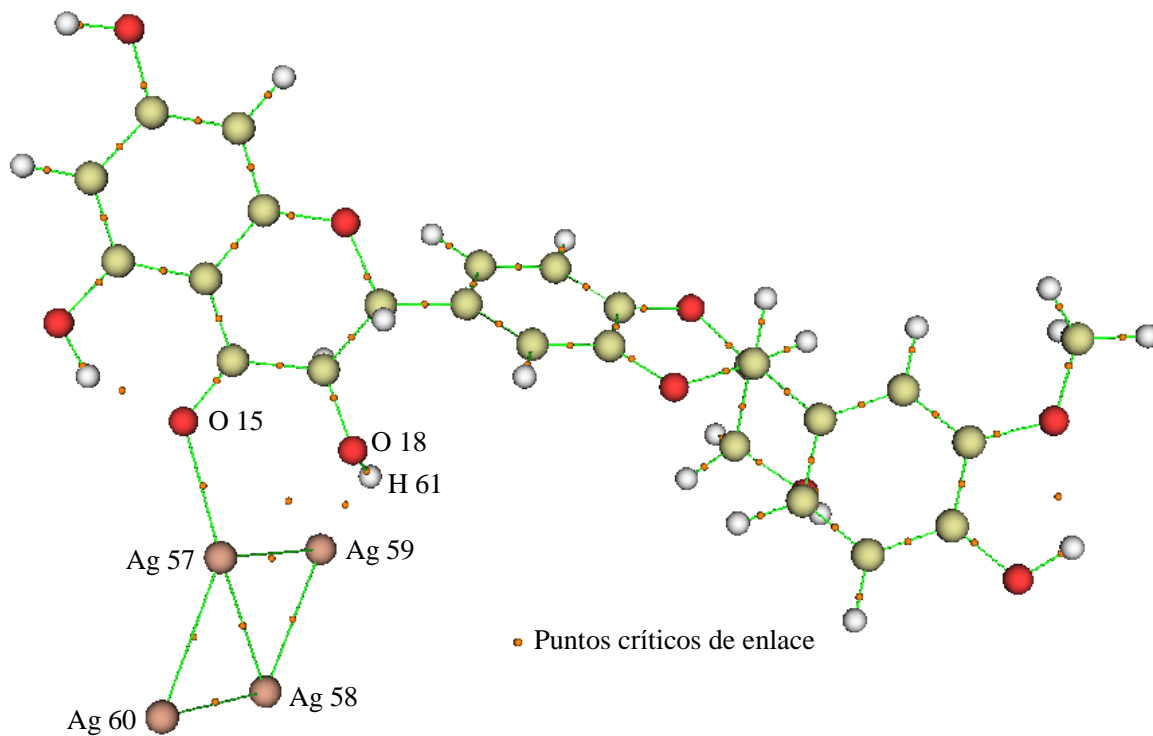


Figura 21. Análisis topológico para Sily-Ag₄.

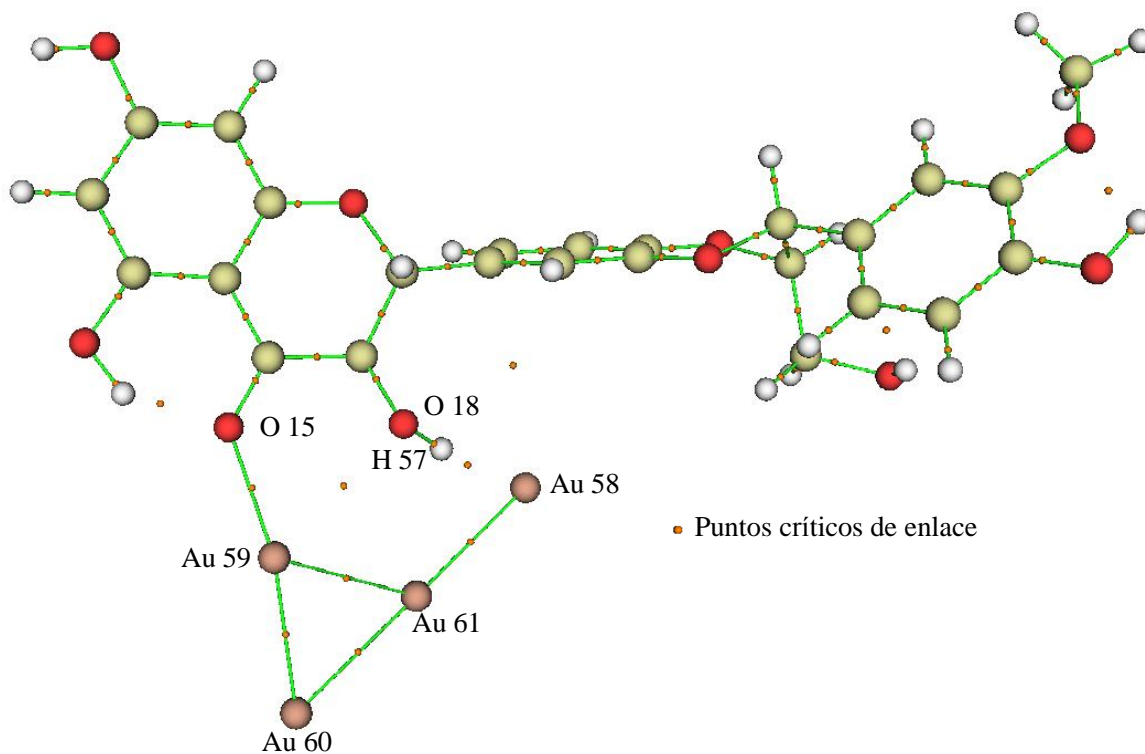


Figura 22. Análisis topológico para Sily-Au₄.

Tabla 8. Análisis del Laplaciano de la densidad electrónica como descriptor topológico

Sistema	Punto crítico de enlace analizado	$\nabla^2\rho$
Sily-Cu ₄	Cu(58)-O(15)	0.491
Sily-Ag ₄	Ag(57)-O(15)	0.207
Sily-Au ₄	Au(59)-O(15)	0.304

Los valores positivos o negativos del Laplaciano de la densidad electrónica indican concentración o disminución de la densidad electrónica en un punto crítico en particular. Se estudió el punto crítico de enlace que une el cúmulo metálico con la silibina. Para todos los casos, el valor del Laplaciano de la densidad electrónica es positivo. De acuerdo con los criterios topológicos generalmente utilizados, para un enlace covalente el Laplaciano de la densidad electrónica debe ser negativo, $\nabla^2\rho < 0$. Sin embargo, se ha reportado que al trabajar con átomos pesados este criterio falla y no se descarta proponer un enlace parcialmente covalente.

En la Figura 23 se presenta un análisis particular de las interacciones no convencionales M-H y M-O para el sistema Sily-Cu₄ a partir de la visualización de las cuencas de superficie generada a partir de la suma de los caminos de los puntos críticos de enlace. Se puede observar que el átomo metálico Cu(59) interactúa tanto con O(18) como con H(57).

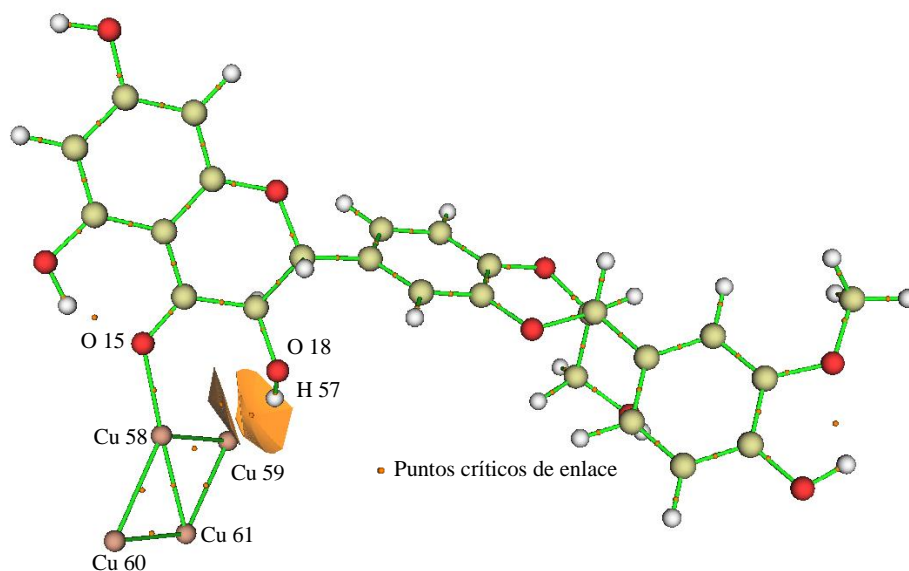


Figura 23. Análisis topológico de las cuencas de superficie para Sily-Ag₄.

En el Apéndice I se puede ver un análisis sobre las energías libres de Gibbs para las reacciones de formación de los sistemas [Sily-M₄] y en el Apéndice H un estudio sobre la interacción de un cúmulo metálico de cuatro átomos de cobre con la silibina desprotonada.

○ MAPA DONADOR-ACEPTOR PARA LA INTERACCIÓN DE CÚMULOS CON SILIBINA

Uno de los aspectos fundamentales para establecer si las moléculas pueden exhibir propiedades interesantes en tejidos biológicos es establecer su capacidad antirradicálica²⁰. En la Figura 24 se presenta el mapa donador-aceptor con la silibina, los tres sistemas Sily-M₄ (M=Cu, Ag, Au) y los radicales libres •OOH, NO₂• y DPPH• además de las moléculas de astaxantina (Asta) y Resveratrol (Resve) conocidas por ser buenos estabilizadores de radicales libres. Se incluye igualmente la especie silibina desprotonada (Sily(-)), pues es interesante la comparación que pueda hacerse con los sistemas que incluyen metales. Esto tiene la finalidad de evaluar si la modificación del pH a valores básicos podría ser más efectiva que la interacción de metales para la donación u acepción de electrones. Se utilizó agua como disolvente para modelar un medio polar.

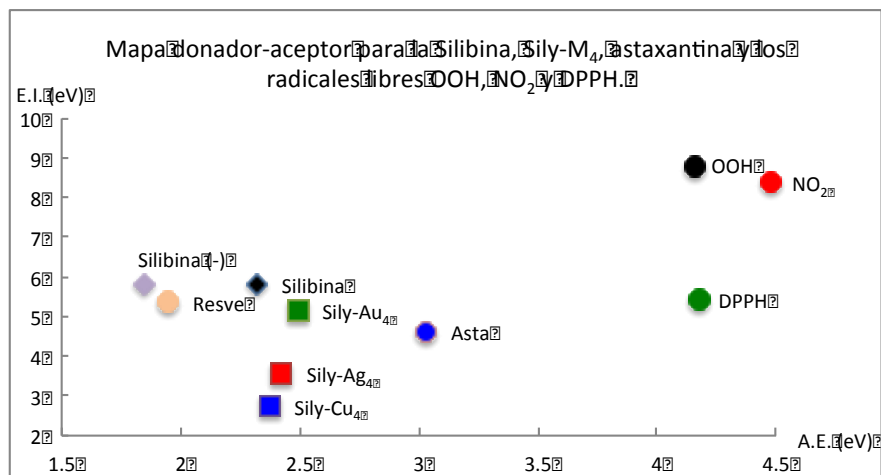


Figura 24. Mapa donador-aceptor para la interacción de cúmulos metálicos a silibina.

Los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄ mejoran en todos los casos las propiedades antirradicálicas (donación y acepción de electrones) de la silibina y la silibina desprotonada, pues tienen menores energías de ionización y mayores afinidades electrónicas. Todos se sitúan abajo a la izquierda en el mapa donador-aceptor. Donar

electrones en los sistemas de cúmulos, con respecto a silibina, es siempre una situación de menor energía.

Sily-Cu₄ y Sily-Ag₄ tienen menores energías de ionización, por lo que son mejores donadores de electrones que Sily-Au₄. Por el contrario, Sily-Au₄ es mejor aceptor electrónico que Sily-Ag₄ y que Sily-Cu₄.

Con respecto a la astaxantina, se observa que ninguno de los sistemas mejora su capacidad aceptora de electrones, sin embargo Sily-Ag₄ y Sily-Cu₄ son mejores donadores ya que tienen menores energías de ionización. Los sistemas [Sily-M₄] mejoran la capacidad de donar y aceptar electrones del resveratrol.

Los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄, Sily-Au₄ y astaxantina son capaces de donar electrones a los radicales libres DPPH•, •OOH, NO₂• porque tienen menores energías de ionización. Por su parte, el radical libre NO₂• es el mejor aceptor de electrones de todo el mapa.

Del mapa donador-aceptor de electrones se puede concluir que la adición de cúmulos metálicos a la silibina mejora sustancialmente las propiedades antirradicálicas de ésta, y que incluso dos de estos sistemas (Sily-Cu₄, Sily-Ag₄) mejoran la capacidad donadora de la astaxantina.

○ ESPECTROS DE CARACTERIZACIÓN

En la siguiente sección se presentan los espectros teóricos de UV-visible y Raman de los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄.

● ESPECTROS UV-VISIBLE

En las Tablas 9, 10 y 11 se presentan de manera sucesiva los valores de los máximos teóricos de absorción, λ_{max} , y en las Figuras 25, 26 y 27, los espectros de UV-visible para los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄ respectivamente.

En las figuras se muestran también los espectros para los cúmulos de Cu, Ag y Au por separado, con la intención de descartar que se estuviera obteniendo una respuesta debida únicamente a la presencia del cúmulo y no a las del cúmulo interactuando con la silibina.

Tabla 9. λ_{\max} para Silibina, Sily-Cu₄ y el cúmulo Cu₄.

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para Silibina, Sily-Cu ₄ y Cu ₄	
Estructura	λ_{\max} (nm)
Silibina	269
Sily-Cu ₄	398
Cu ₄	410

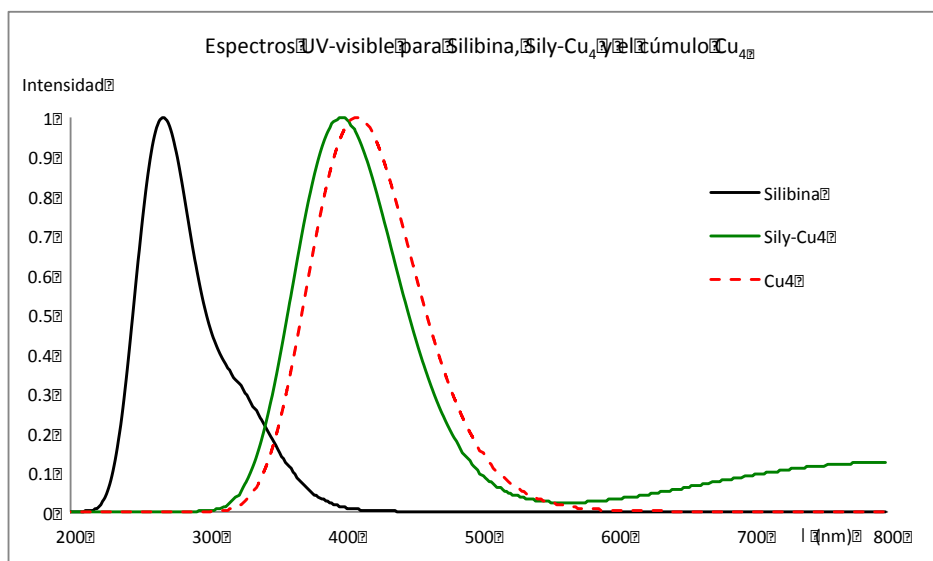


Figura 25. Espectros UV-visible para Sily-Cu₄.

El único caso en el que es posible comparar los valores teóricos con un resultado experimental es en el espectro de UV-visible de Sily-Ag₄ (Tabla 10). El máximo de absorción experimental de la interacción de Ag a silibina es de 417 nm, mientras que el máximo de absorción para Sily-Ag₄ es de 435 nm, lo que representa un error menor a 6% con respecto al valor experimental.

Tabla 10. λ_{\max} para Silibina, Sily-Ag₄ y el cúmulo Ag₄.

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para Silibina, Sily-Ag ₄ y Ag ₄	
Estructura	λ_{\max} (nm)
Silibina	269
Sily-plata _(exp)	417
Sily-Ag ₄	435
Ag ₄	302/427

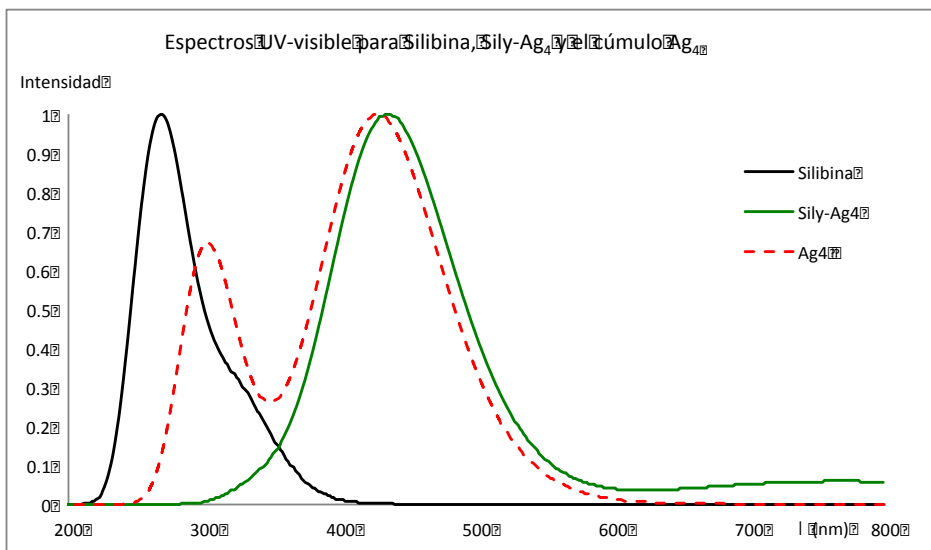


Figura 26. Espectros UV-visible para Sily-Ag₄.

Tabla 11. λ_{\max} para Silibina, Sily-Au₄ y el cúmulo Au₄.

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para Silibina, Sily-Au₄ y Au₄

Estructura	λ_{\max} (nm)
Silibina	269
Sily-Au ₄	405
Au ₄	416

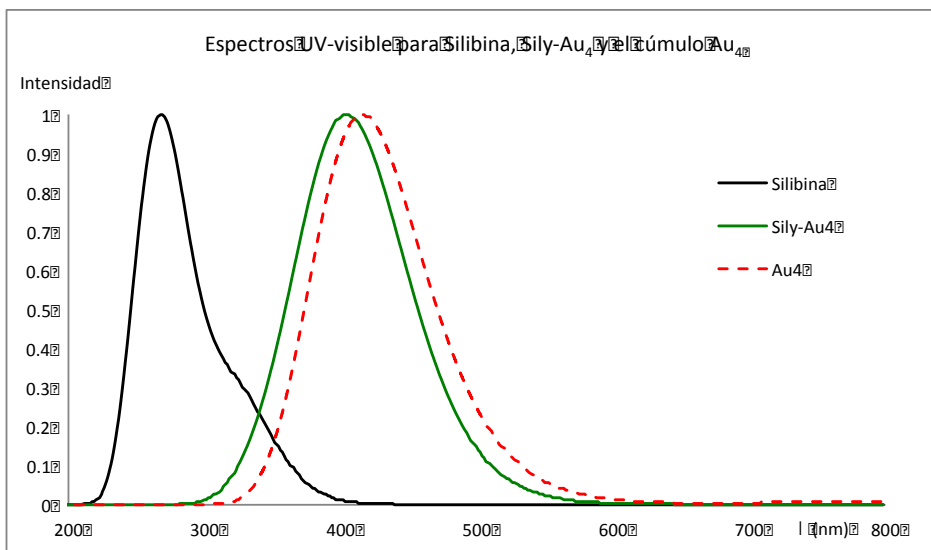


Figura 27. Espectros UV-visible para Sily-Au₄.

En los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄ se observa un desplazamiento significativo del máximo de longitud de onda de absorción en el espectro teórico de UV-visible hacia valores mayores con respecto a la silibina.

Los máximos en los sistemas de estudio corresponden al intervalo de la región visible del espectro electromagnético, lo que facilitaría la detección de silibina.

Con base en estos espectros se establece que hay diferencias significativas entre las longitudes de onda de máxima absorción, por lo que la interacción de cúmulos metálicos podría ayudar a detectar indirectamente silimarina.

- ESPECTROS RAMAN

En las Figuras 28, 29 y 30 se presentan los espectros Raman para los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄. En todos los espectros se muestra además el espectro Raman de la silibina y del cúmulo M₄ (M=Cu, Ag, Au) con el objetivo de comparar analíticamente las diferencias entre cada tipo de espectro.

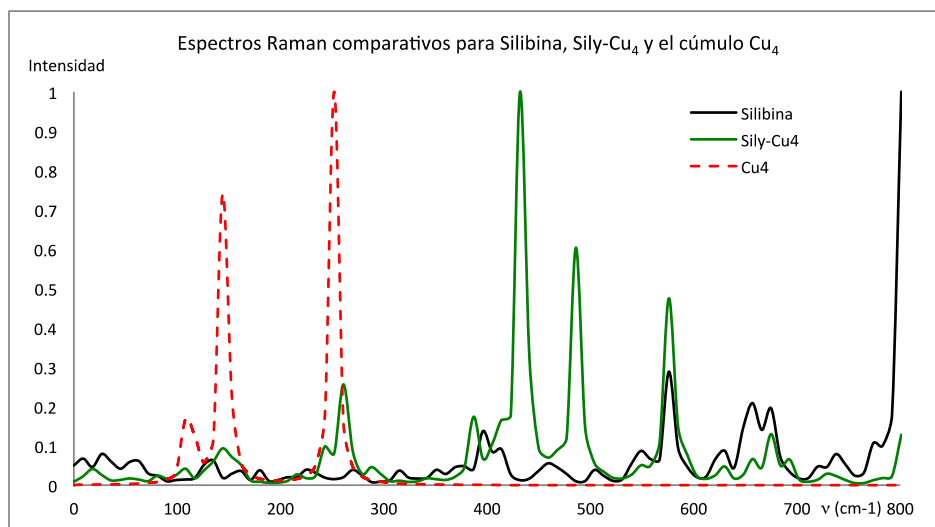


Figura 28. Espectro Raman para Sily-Cu₄.

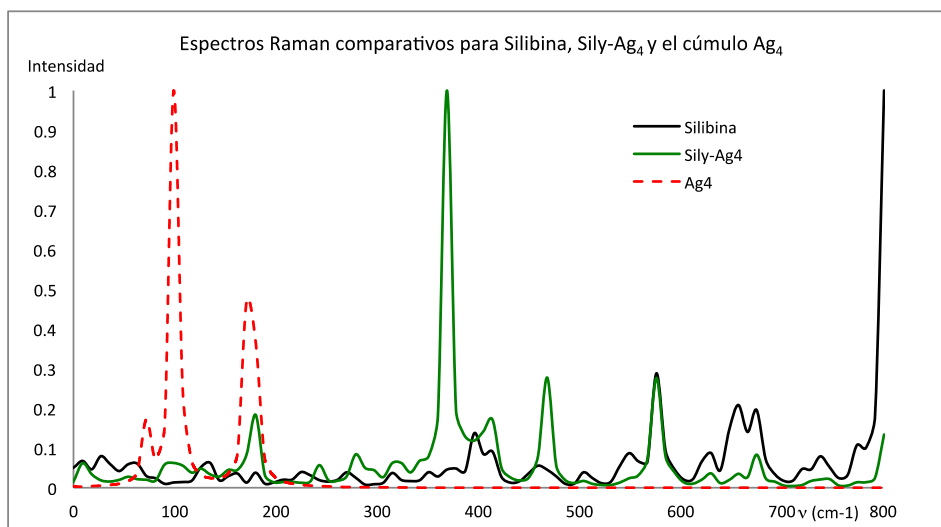


Figura 29. Espectro Raman para Sily-Ag₄.

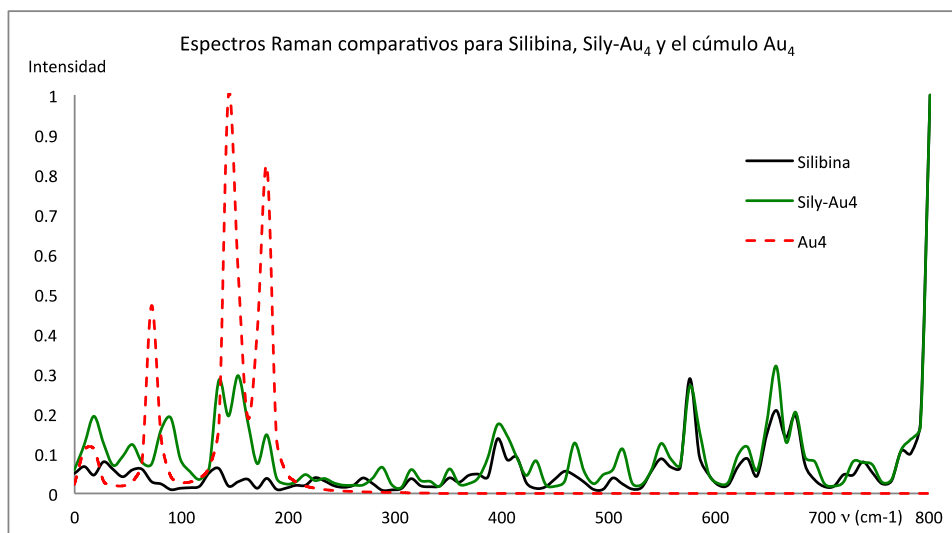


Figura 30. Espectro Raman para Sily-Au₄.

En los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄, las señales de Raman se intensifican notablemente con respecto a la silibina, por lo que la adición de cúmulos metálicos, sobre todo de Cu y Ag, parecen ser un método analítico adecuado para detectar sensiblemente silibina.

Se observa que hay picos alrededor de 100 cm⁻¹ que corresponden únicamente a frecuencias de vibración en el cúmulo (espectros punteados); sin embargo, estos picos decrecen en los sistemas Sily-M₄.

El sistema Sily-Cu₄ es el que más modifica el espectro de la silibina con dos picos característicos en el intervalo entre 400 y 500 cm⁻¹.

De las respuestas espectroscópicas observadas, de los desplazamientos de los máximos de absorción en el espectro UV-visible y del incremento en la intensidad de los picos en los espectros Raman, se puede concluir que la interacción de los cúmulos metálicos con la silibina se podría facilitar la detección de silibina.

3. INTERACCIÓN DE CÚMULOS METÁLICOS DE Cu, Ag Y Au Y CON SILIBINA COMO SISTEMAS CARGADOS

Se propone el estudio de la interacción de cúmulos metálicos en la posición R₃-CO con la silibina como sistemas globalmente cargados: 0, +1 y +2 para Cu, 0 y +1 para Ag y 0, +1 y +3 para Au porque se tiene conocimiento de que experimentalmente debe llevarse a cabo la reducción de Ag⁺ a Ag⁰. Esto puede resultar interesante para conocer si a partir de un cúmulo de cuatro átomos los sistemas se encuentran ya reducidos.

○ DESCRIPCIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS CÚMULOS METÁLICOS CARGADOS Y LA SILIBINA

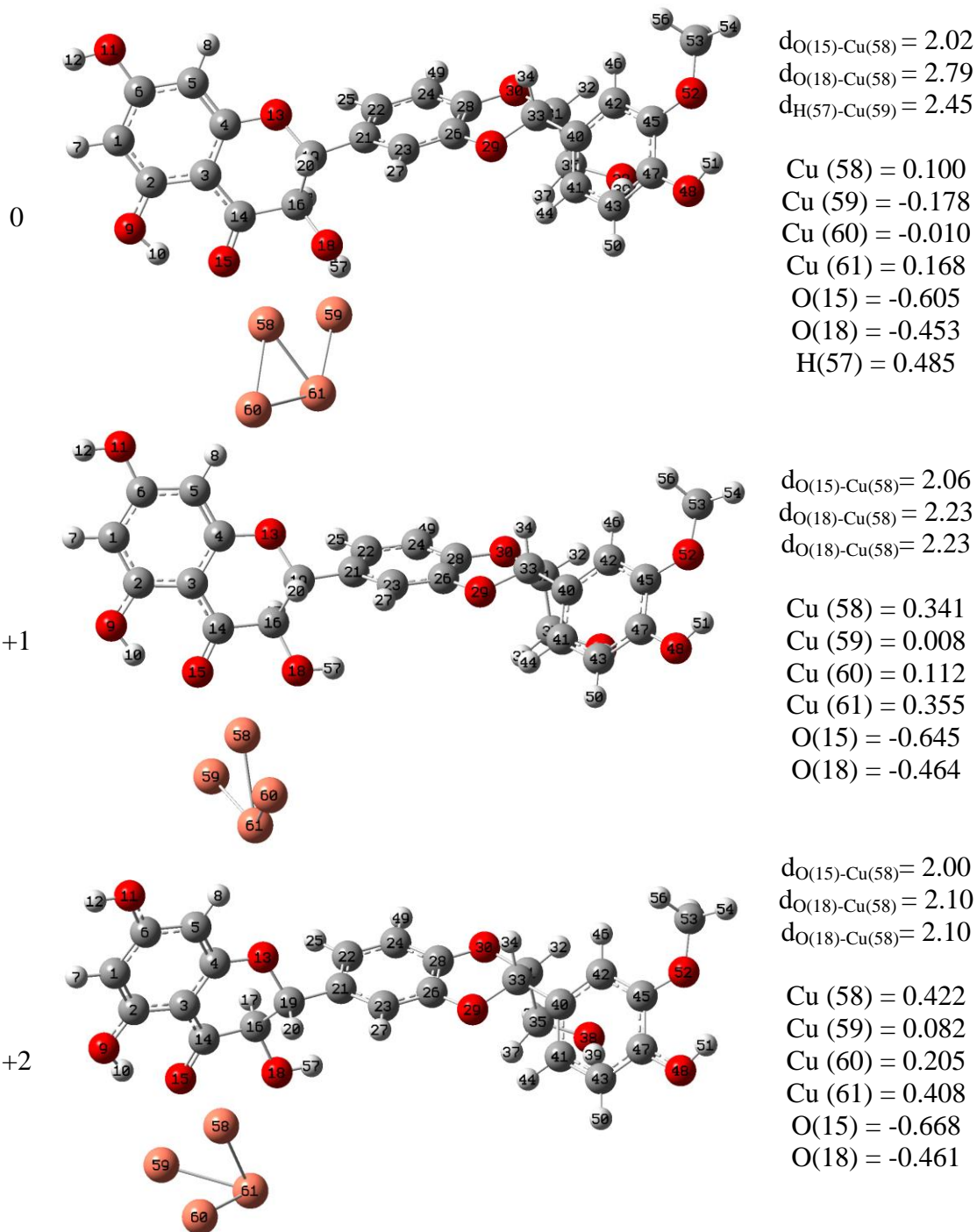
En las Figuras 31, 32 y 33 se presentan las estructuras optimizadas de los sistemas Sily-M₄ y [Sily-M₄]^{a+}; donde a=estado de oxidación más común para cada metal; con las distancias más importantes y las cargas de Mulliken de los átomos más próximos donde se lleva a cabo la interacción.

Como uno de los objetivos principales de este trabajo es plantear una mejora de carácter experimental al pensar en la posible sustitución de Ag por Cu, se muestra un análisis más detallado de las estructuras Sily-Cu₄, [Sily-Cu₄]⁺ y [Sily-Cu₄]²⁺.

M Q

Estructura

Distancias (Å)
Cargas de Mulliken



$Cu(58) = 0.100$
 $Cu(59) = -0.178$
 $Cu(60) = -0.010$
 $Cu(61) = 0.168$
 $O(15) = -0.605$
 $O(18) = -0.453$
 $H(57) = 0.485$

$Cu(58) = 0.341$
 $Cu(59) = 0.008$
 $Cu(60) = 0.112$
 $Cu(61) = 0.355$
 $O(15) = -0.645$
 $O(18) = -0.464$

$Cu(58) = 0.422$
 $Cu(59) = 0.082$
 $Cu(60) = 0.205$
 $Cu(61) = 0.408$
 $O(15) = -0.668$
 $O(18) = -0.461$

Figura 31. Estructuras optimizadas de los sistemas Sily-Cu₄, [Sily-Cu₄]⁺ y [Sily-Cu₄]²⁺.

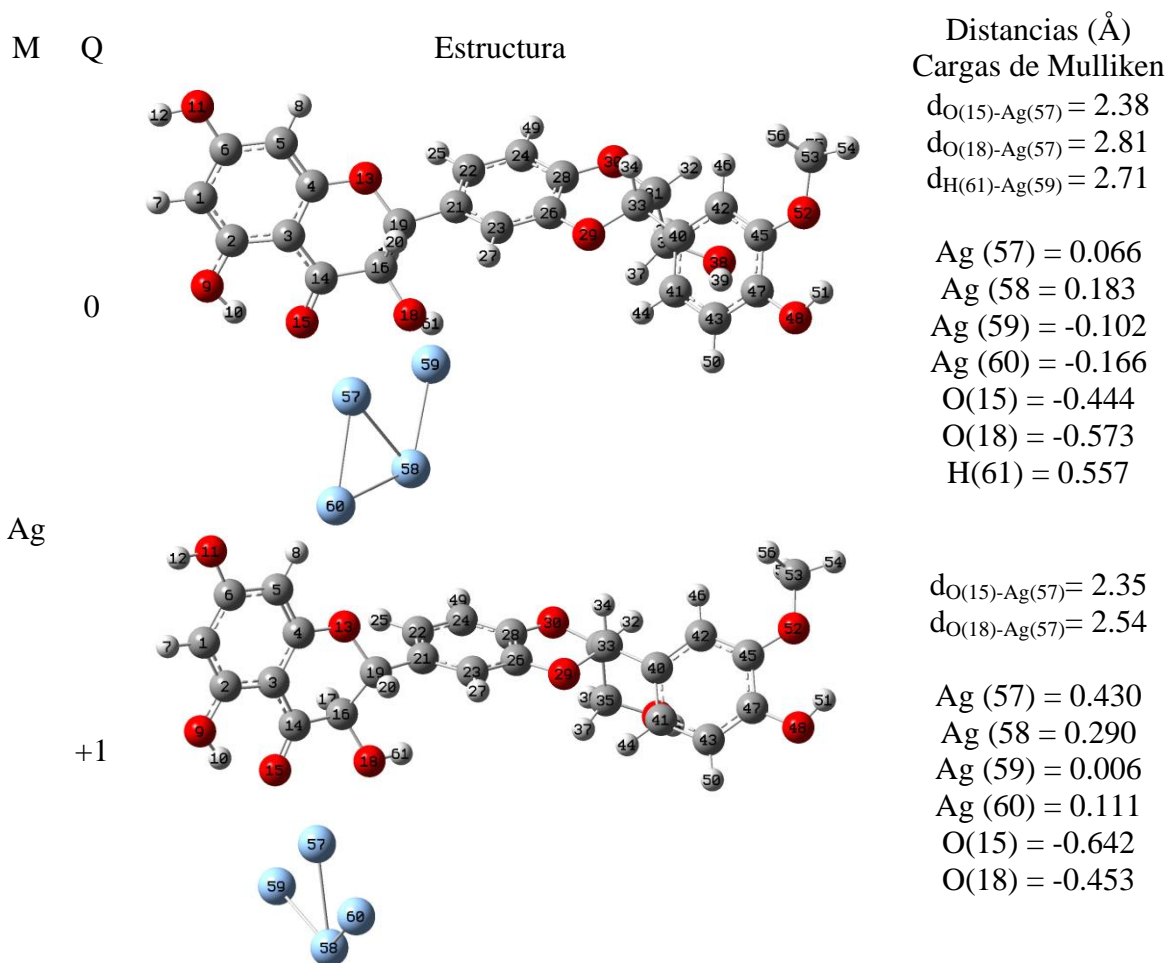


Figura 32. Estructuras optimizadas de los sistemas Sily-Ag₄ y [Sily-Ag₄]⁺.

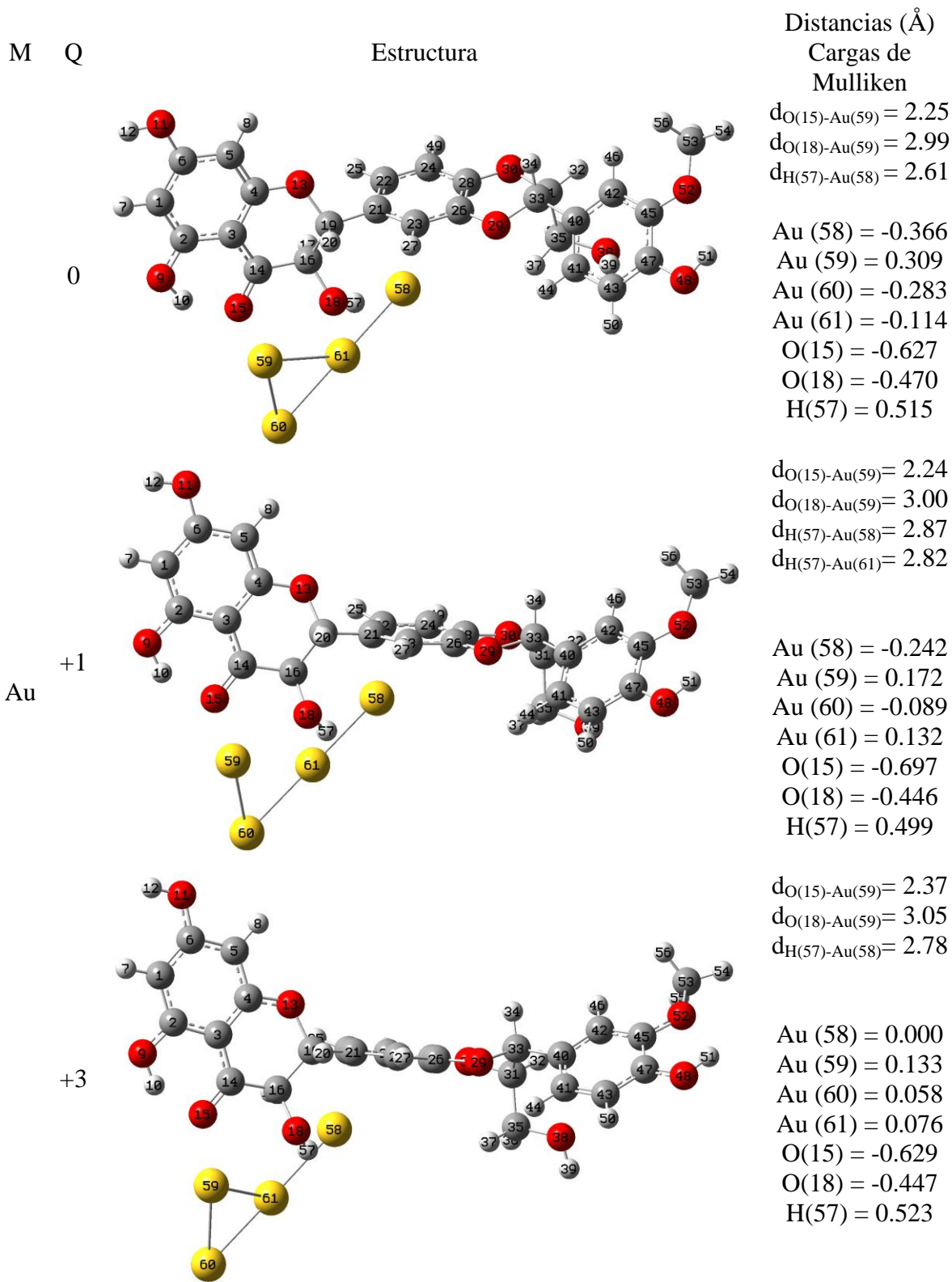


Figura 33. Estructuras optimizadas de los sistemas Sily-Au₄, [Sily-Au₄]⁺ y [Sily-Au₄]³⁺.

La geometría de los cúmulos puede variar significativamente o muy poco como función de la carga y de la naturaleza del cúmulo. Para los metales Cu y Ag, Figuras 31 y 32 respectivamente, se observan variaciones en la geometría del cúmulo como función de la carga global del sistema. Ningún sistema: $[\text{Sily-Cu}_4]^+$, $[\text{Sily-Cu}_4]^{2+}$ ni $[\text{Sily-Ag}_4]^+$ presenta puentes de hidrógeno no convencionales M-H. La interacción entre el cúmulo metálico y la silibina se lleva a cabo directamente entre el átomo metálico Cu(58) y Ag(57) y el O del carbonilo, C=O, de la silibina.

Por el contrario, las geometrías de los cúmulos de Au varían muy poco como función de la carga global del sistema, Figura 33. En los tres casos estudiados: $[\text{Sily-Au}_4]$, $[\text{Sily-Au}_4]^+$ y $[\text{Sily-Au}_4]^{3+}$ hay puentes de hidrógeno no convencionales M-H.

Las distancias entre O(15) y los átomos Cu (58), Ag(57) y Au(59) prácticamente no varían como función de la carga del sistema, todas se encuentran dentro del intervalo de interacciones fuertes menores de 2.5 Å.

En cuanto a las cargas, se encuentran similitudes marcadas entre las estructuras de interacción de Cu y Ag con silibina, mientras que los sistemas de Au con silibina presentan un comportamiento distinto.

Para los sistemas de Cu y Ag, a medida que aumenta la carga global del sistema, los átomos Cu(58) y Ag(57) incrementan igualmente sus valores positivos de carga, lo que indica una interacción electrostática cada vez más fuerte. Por el contrario, en las estructuras de Au, a medida que la carga del sistema aumenta, los valores de carga decrecen, quizá debido al aumento en la distancia Au(59)-O(15). En todos los sistemas de Au, la carga del átomo Au(58) que participa en los puentes de hidrógeno no convencionales es negativa (o cero) lo que es lógico pues la carga del H(57) es siempre positiva.

- MAPAS DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

En la Figura 34 se presentan los mapas de potencial electrostático para los sistemas Sily-Cu₄ como función de la carga (0, +1 y +2) para analizar cómo se distribuye la carga en el cúmulo y, sobre todo, para analizar cambios significativos de carga en todo el sistema.

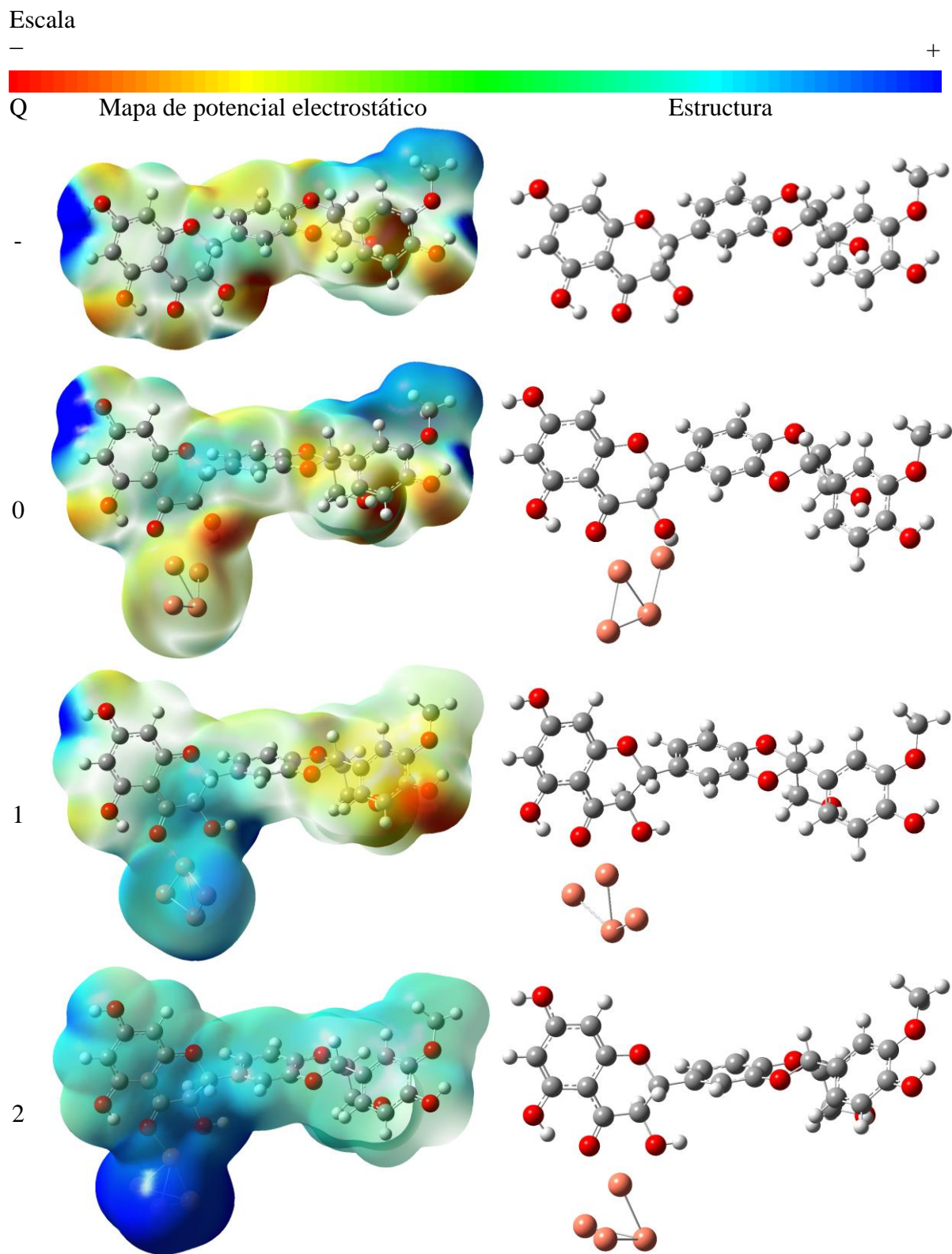
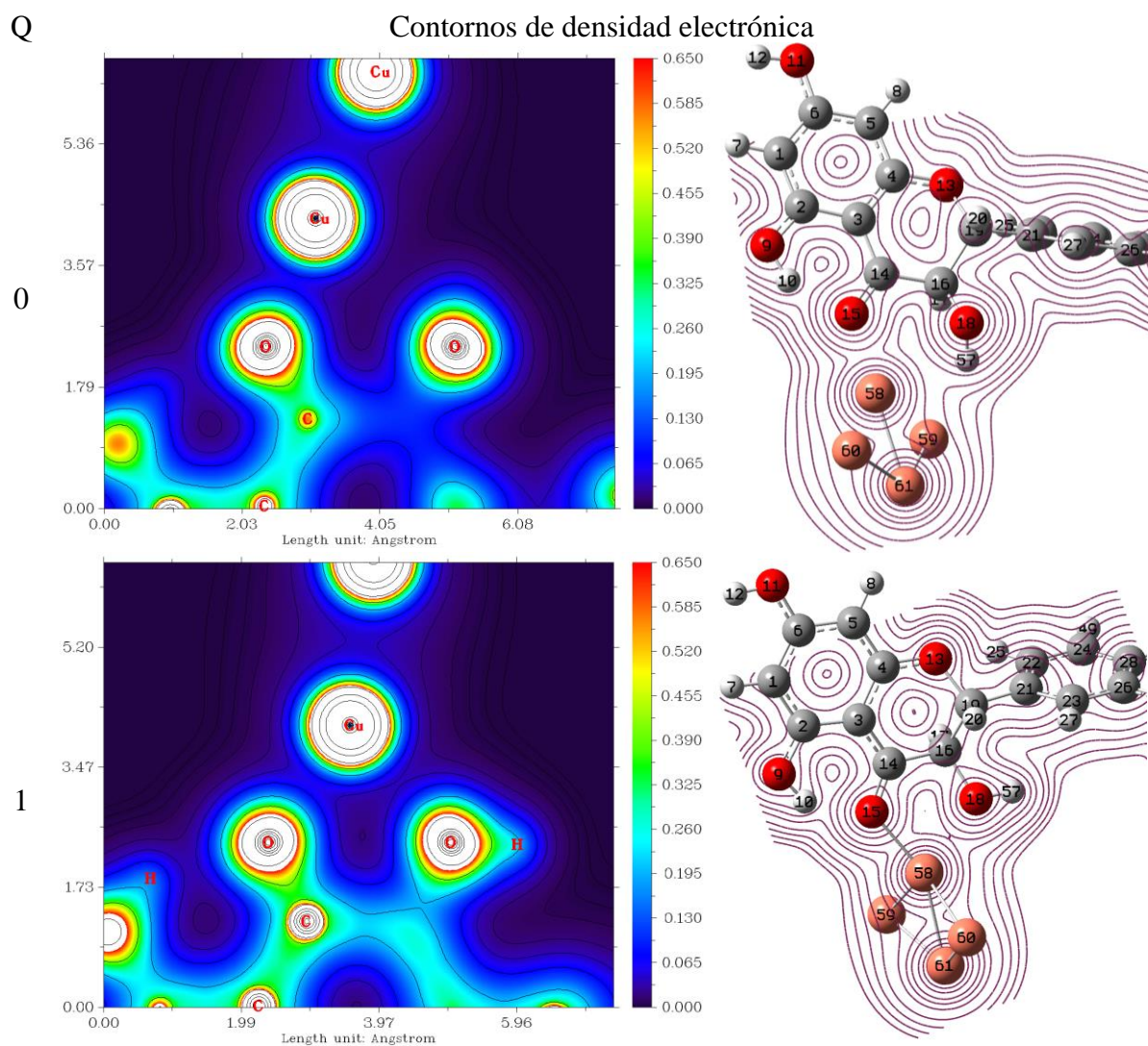


Figura 34. MPE para Sily-Cu₄ como sistemas con carga= 0, +1 y +2.

A medida que la carga aumenta, el cúmulo se va haciendo cada vez más positivo y la vecindad con la silibina cambia progresivamente hasta que toda la distribución de carga es distinta. En los sistemas de Cu neutros y con carga +1, los cambios son menores que cuando el sistema está cargado +2.

- CONTORNOS DE DENSIDAD

Como parte del estudio de la interacción de los cúmulos metálicos de Cu con la silibina como función de la carga, se obtuvieron los contornos de densidad para cada sistema, Figura 35.



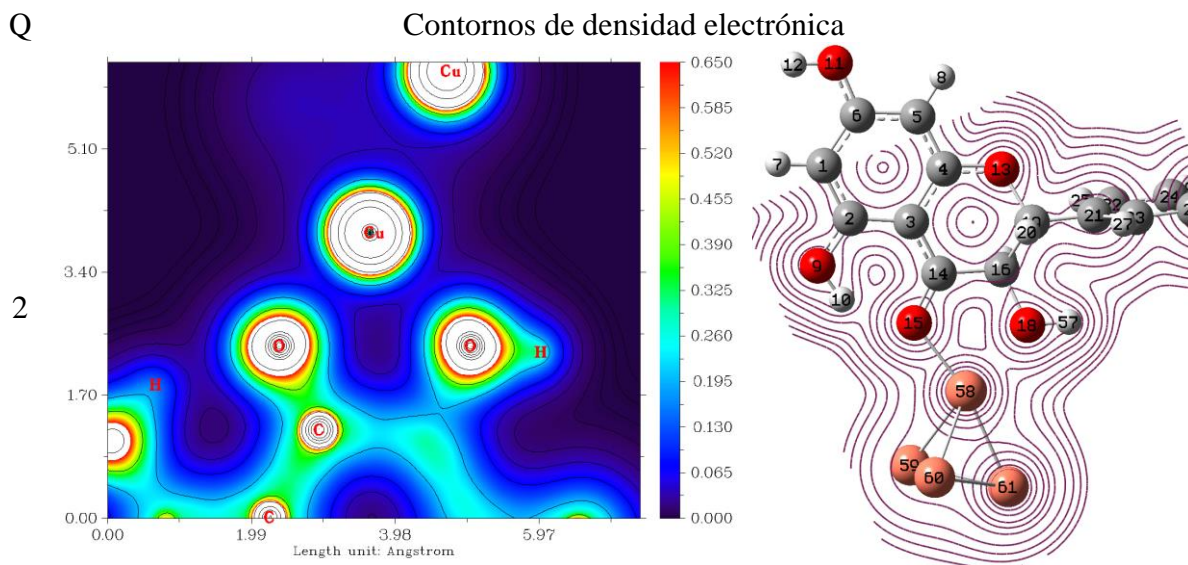


Figura 35. Contornos de densidad para Sily-Cu₄ como sistemas con carga= 0, +1,+2.

Los contornos de densidad muestran que a medida que la carga del sistema aumenta, la densidad electrónica compartida se incrementa. El carácter covalente de las interacciones entre Cu(58) y los oxígenos O(15) del C=O y O(18) del –OH en R₃ podría ser cada vez mayor. Además, conforme la carga aumenta, se observan distancias más cortas entre Cu(58) y O(18). Esto podría aportar mayor estabilidad en los sistemas pues se observa aparentemente la incipiente formación de un anillo de cinco miembros constituido por los átomos O(15), Cu(58), O(18), C(16) y C(14).

En el Apéndice I puede verse un análisis sobre las energías libres de Gibbs para las reacciones de formación de los sistemas [Sily-M₄]^{a+}.

○ MAPA DONADOR-ACEPTOR PARA LA INTERACCIÓN DE CÚMULOS METÁLICOS CARGADOS A SILIBINA

En la Figura 36, se presenta el mapa donador-aceptor para los sistemas de interacción de cúmulos metálicos con silibina como función de la carga. Para llevar a cabo la comparación se incluyeron las moléculas de silibina y silibina desprotonada, astaxantina y resveratrol y los radicales libres •OOH, NO₂• y DPPH•. Se utilizó agua como disolvente para modelar un medio polar.

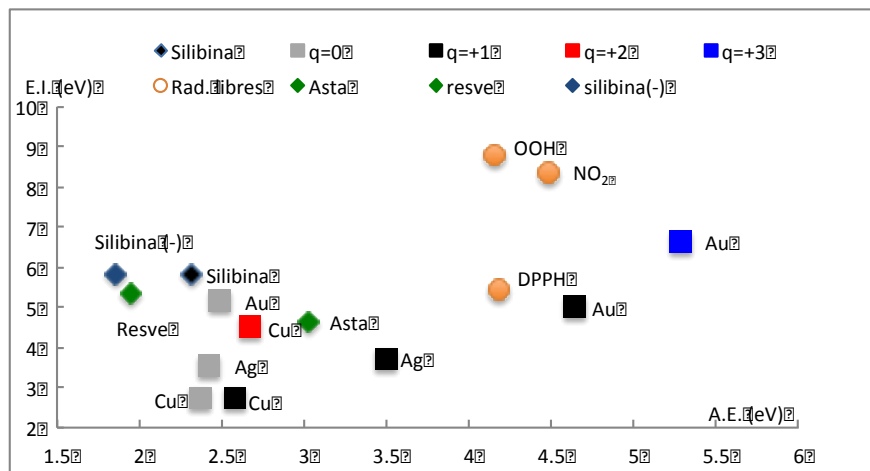


Figura 36. Mapa donador-aceptor para la interacción de cúmulos metálicos con silibina como sistemas cargados en comparación con la silibina, la astaxantina y el resveratrol y los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$.

Todos los sistemas de interacción de cúmulos metálicos con silibina mejoran las propiedades antirradicálicas de la silibina, salvo el sistema $[\text{Sily-Au}_4]^{3+}$, que únicamente es mejor receptor de electrones que la silibina. Estos sistemas tienen menores energías de ionización y mayores afinidades electrónicas que la silibina, por lo que ceder y aceptar electrones es una situación de menor energía comparada con la silibina.

Todos los sistemas cargados son mejores aceptores de electrones que sus homólogos neutros y, a medida que aumenta la carga, aumenta la capacidad de aceptar electrones. De igual forma, conforme aumenta la carga, disminuye la capacidad de los sistemas para donar electrones. El mejor receptor de electrones es $[\text{Sily-Au}_4]^{3+}$, mientras que los mejores donadores son Sily-Cu_4 y $[\text{Sily-Cu}_4]^+$.

Salvo los sistemas cargados de Au, todos los demás pueden donar electrones a los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$ y así estabilizarlos. Cabe resaltar que el único sistema que mejora las propiedades antirradicálicas de la astaxantina, es decir su facilidad para donar y aceptar electrones, es $[\text{Sily-Ag}_4]^+$. Su posición en el mapa está debajo y a la derecha de la astaxantina, lo que significa que tiene menor energía de ionización y mayor afinidad electrónica.

Se puede concluir que las propiedades antirradicáticas de los cúmulos metálicos que interactúan con silibina dependen de la carga global del sistema.

○ ESPECTROS DE CARACTERIZACIÓN

Se presentan los espectros de caracterización para los cúmulos de cuatro átomos de Cu, Ag y Au como sistemas cargados interactuando con silibina.

• ESPECTROS UV-VISIBLE

Se presentan de manera sucesiva las tablas 12, 13 y 14 con los valores de los máximos teóricos de absorción, λ_{\max} , y en las Figuras 37, 38 y 39 se muestran los espectros de UV-visible.

Tabla 12. λ_{\max} para silibina y los sistemas Sily-Cu₄ como función de la carga

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para la interacción de cúmulos de Cu		
Estructura	Carga	λ_{\max} (nm)
Silibina	-	269
	0	398
Sily-Cu ₄	+1	606
	+2	1149

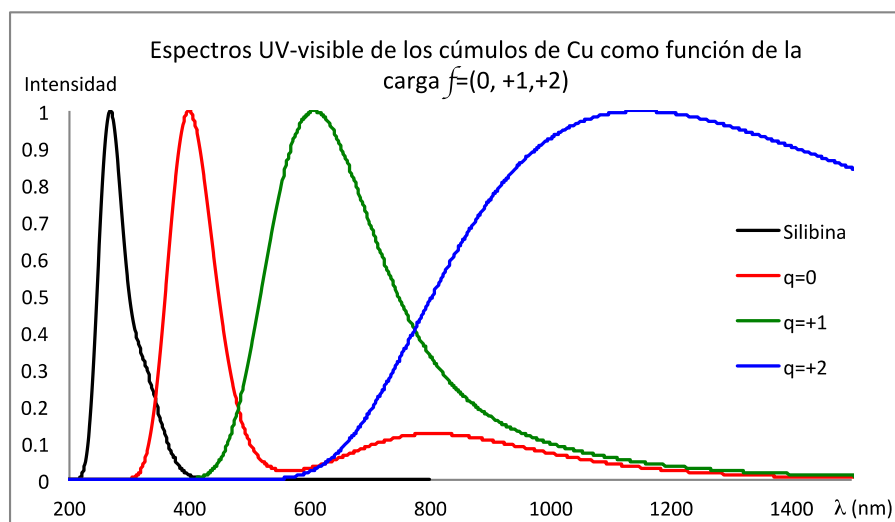


Figura 37. Espectro UV-visible para Sily-Cu₄ como función de la carga del sistema.

Tabla 13. λ_{\max} para silibina y los sistemas Sily-Ag₄ como función de la carga

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para la interacción de cúmulos de Ag		
Estructura	Carga	λ_{\max} (nm)
Silibina	-	269
Sily-Ag ₄	0	435
	+1	638

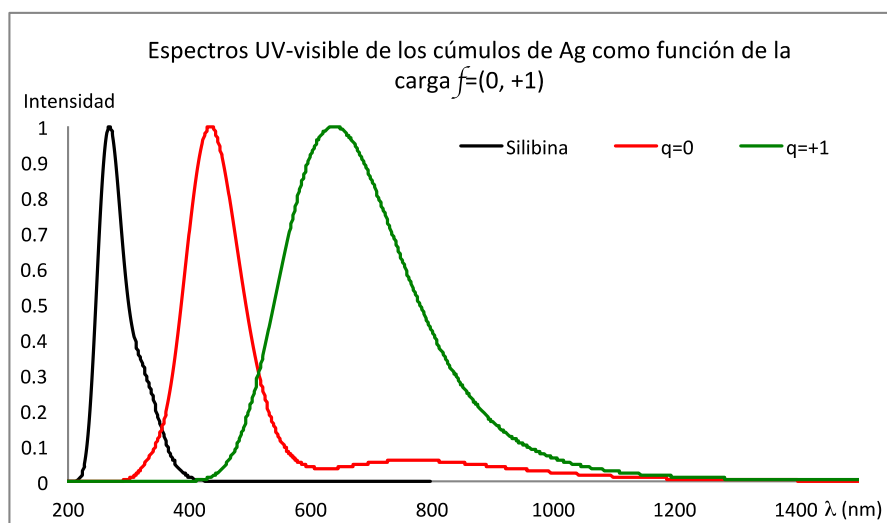


Figura 38. Espectro UV-visible para Sily-Ag₄ como función de la carga del sistema.

Tabla 14. λ_{\max} para silibina y los sistemas Sily-Au₄ como función de la carga

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para la interacción de cúmulos de Au		
Estructura	Carga	λ_{\max} (nm)
Silibina	-	269
Sily-Au ₄	0	405
	+1	1275
	+3	990

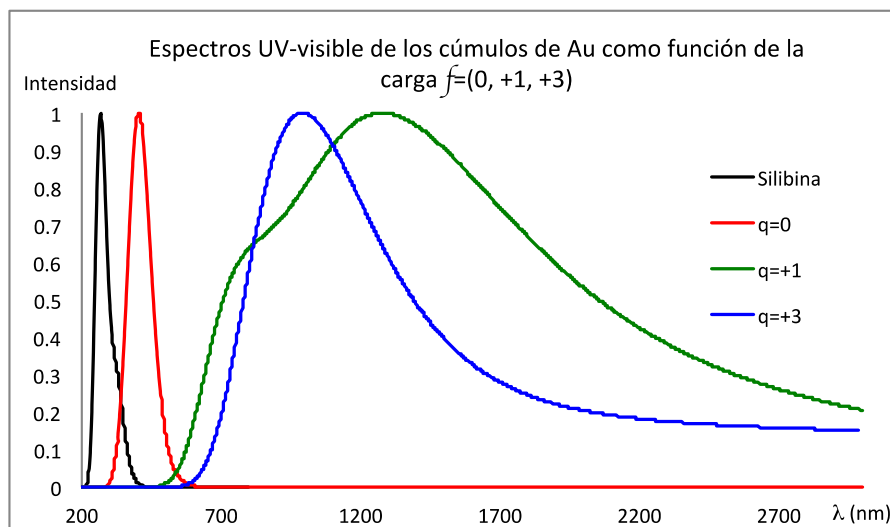


Figura 39. Espectro UV-visible para Sily-Au₄ como función de la carga del sistema.

En los espectros de UV-visible teóricos se observan cambios importantes en cuanto a la posición de los máximos de absorción en los sistemas cargados. El desplazamiento de los máximos de absorción hacia longitudes de onda mayores es tan significativo que ni siquiera se encuentran en la región visible del espectro electromagnético.

El máximo de absorción para el sistema de Ag cargado +1 difiere considerablemente del obtenido experimentalmente ($\lambda_{\text{max}}=417\text{nm}$). Esto podría dar indicios sobre a partir de cuántos átomos se reducen los metales para formar nanopartículas.

- ESPECTROS RAMAN

En las Figuras 40, 41 y 42 se presentan los espectros Raman para los sistemas Sily-Cu₄, Sily-Ag₄ y Sily-Au₄ como función de la carga global de los sistemas.

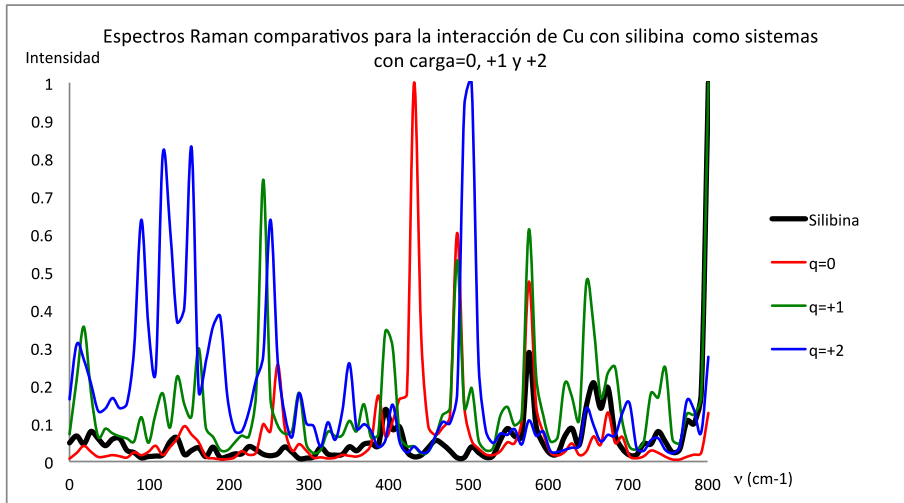


Figura 40. Espectro Raman para Sily-Cu₄ como función de la carga del sistema.

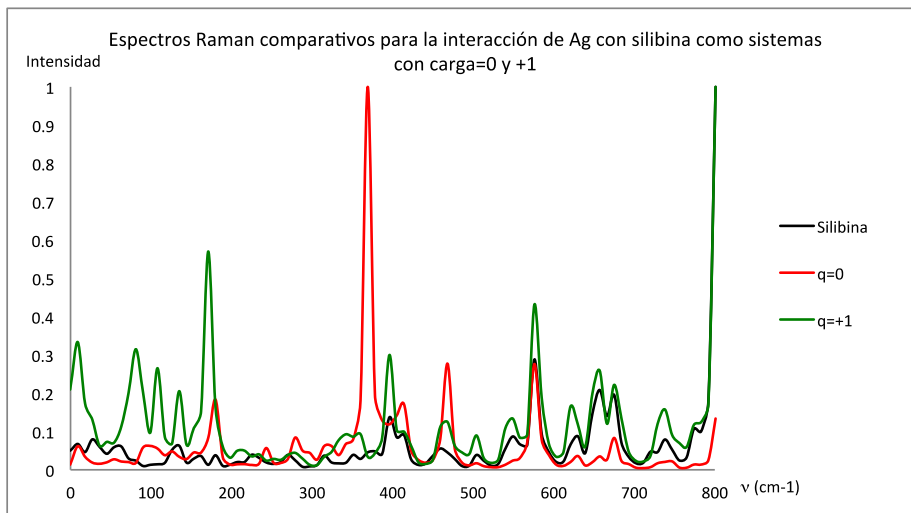


Figura 41. Espectro Raman para Sily-Ag₄ como función de la carga del sistema.

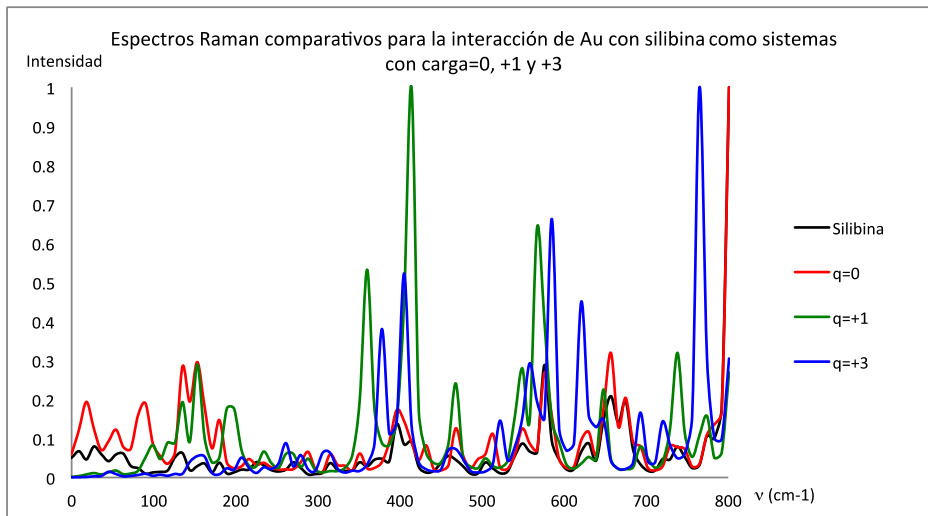


Figura 42. Espectro Raman para Sily-Au₄ como función de la carga del sistema.

Para todos los casos estudiados, se observa un incremento considerable en la intensidad de los picos en los espectros Raman. La cantidad y la distribución de picos es suficiente en todos los casos para diferenciar teóricamente el estado de oxidación de los metales, pero sobre todo para distinguirlos de la silibina.

A medida que la carga del sistema incrementa, las señales más intensas se recorren a menores valores de frecuencia. Casi todos los picos que caracterizan los sistemas cargados +1 y +2 de los cúmulos de Ag y Cu respectivamente se sitúan antes de los 300 cm^{-1} .

Sin importar la carga del sistema, los espectros Raman parecen ser una buena herramienta analítica para detectar con sensibilidad la presencia de silibina.

4. INTERACCIÓN DE CÚMULOS MIXTOS BINARIOS Y TERNARIOS EN SILIBINA

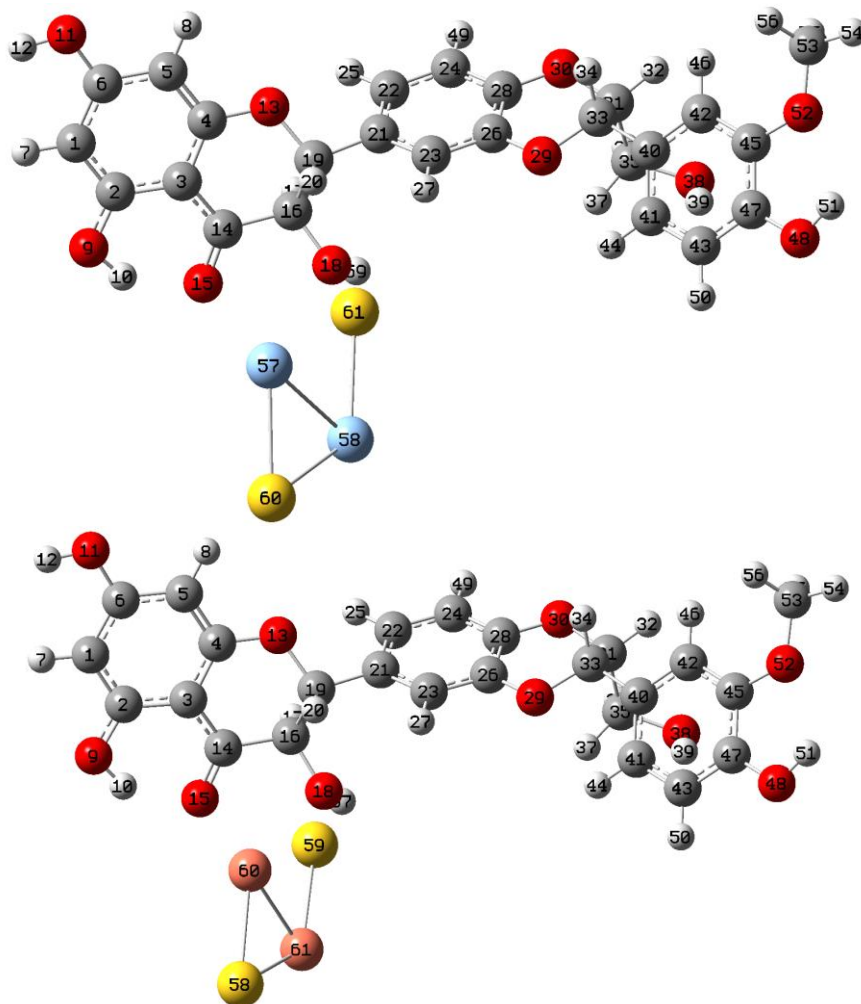
Uno de los propósitos de este trabajo es analizar si la modificación en la naturaleza de los cúmulos puede modificar los espectros de UV-visible y Raman y modular las propiedades antirradicáticas de los sistemas de interacción con la silibina. Para ello se estudió una serie de cúmulos mixtos binarios y ternarios de las combinaciones de $\text{Ag}_2\text{-Au}_2$, $\text{Au}_2\text{-Cu}_2$ y $\text{Ag}_2\text{-Cu}_2$ y finalmente el cúmulo ternario Ag-Au-Cu añadidos en la posición $\text{R}_3\text{-CO}$ de la silibina.

Se sabe que la síntesis y producción de este tipo de sistemas es posible y se encuentra en auge precisamente por sus características particulares; se obtienen sistemas *ad hoc* para dar soluciones muy específicas²¹.

En la Figura 43 se muestran las geometrías optimizadas con las distancias de enlace más importantes y las cargas de los átomos involucrados en la interacción $\text{Sily-}[\text{M}_{x2}\text{-M}_{y2}]$ (con x y $y = \text{Cu, Ag y Au}$, x y y diferentes) y $\text{Sily-}[\text{Cu-Ag-Au}]$.

○ OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE LOS CÚMULOS MIXTOS MÁS ESTABLES

Estructura



Distancias (Å)
Cargas de
Mulliken

$$d_{\text{H}(59)\text{-Au}(61)} = 2.54$$

$$d_{\text{O}(15)\text{-Ag}(57)} = 2.39$$

$$d_{\text{O}(18)\text{-Ag}(57)} = 2.73$$

$$\text{Ag}(57) = 0.606$$

$$\text{Ag}(58) = 0.349$$

$$\text{Au}(60) = -0.488$$

$$\text{Au}(61) = -0.577$$

$$\text{O}(15) = -0.580$$

$$\text{O}(18) = -0.475$$

$$\text{H}(59) = 0.509$$

$$d_{\text{H}(57)\text{-Au}(59)} = 2.55$$

$$d_{\text{O}(15)\text{-Cu}(60)} = 2.06$$

$$d_{\text{O}(18)\text{-Cu}(60)} = 2.54$$

$$\text{Au}(58) = -0.520$$

$$\text{Au}(59) = -0.671$$

$$\text{Cu}(60) = 0.579$$

$$\text{Cu}(61) = 0.445$$

$$\text{O}(15) = -0.602$$

$$\text{O}(18) = -0.481$$

$$\text{H}(57) = 0.501$$

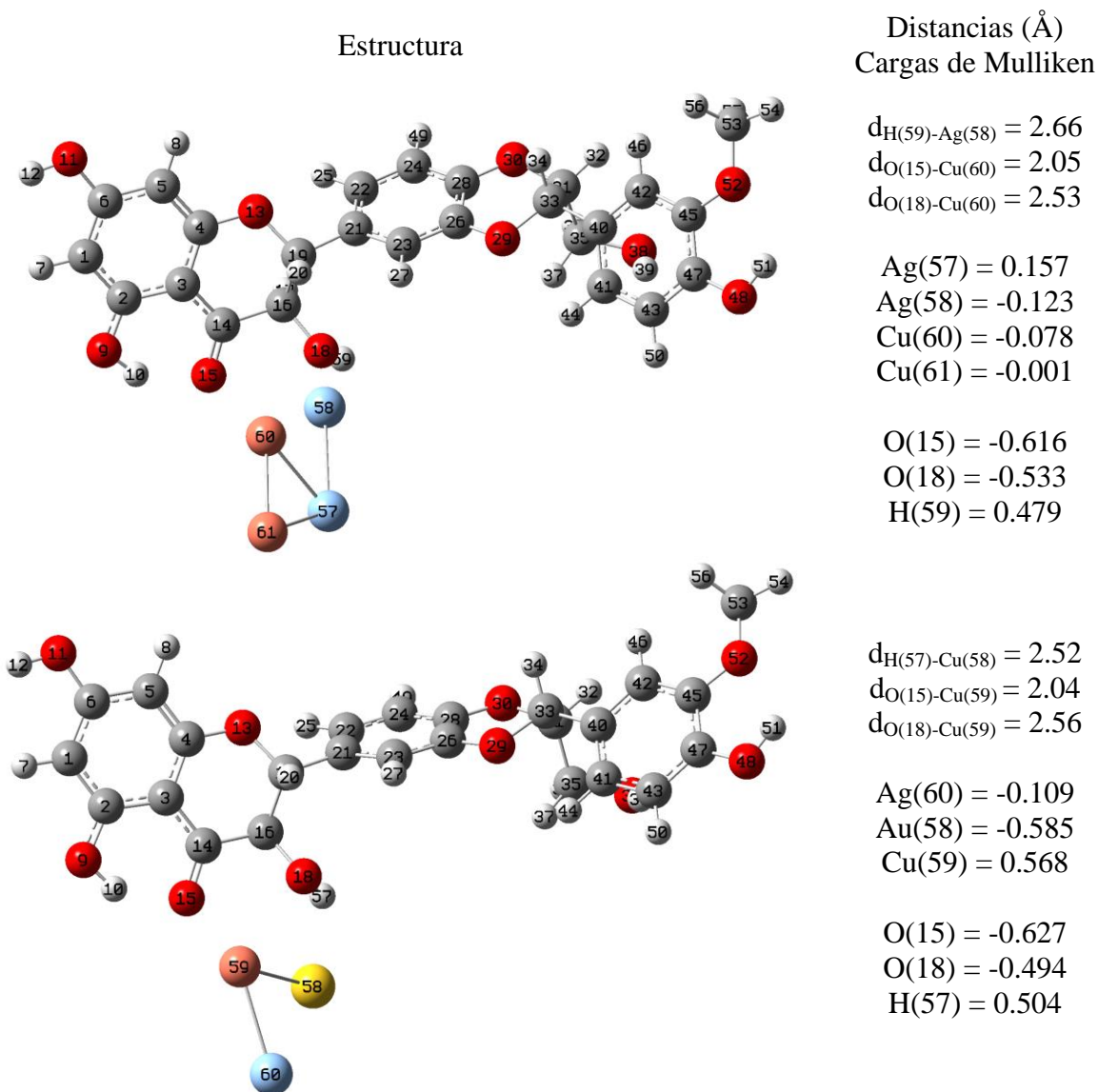


Figura 43. Estructuras optimizadas de la interacción de cúmulos binarios y ternarios con silibina.

De las geometrías optimizadas más estables, los sistemas donde los cúmulos son binarios (cuatro átomos) la multiplicidad del sistema es singulete, mientras que el sistema que presenta un cúmulo ternario (tres átomos), es doblete. La geometría de los cúmulos binarios es muy parecida a la de los cúmulos de un tipo de átomo metálico es decir, romboédrico distorsionado y con distancias similares entre la parte metálica y la silibina. De nuevo se observan los puentes de hidrógeno no convencionales M-H que podrían ayudar a la estabilización del sistema.

Siempre que participa, el átomo de Cu es el más cercano a la silibina, y las cargas de los átomos más cercanos a la molécula de silibina son positivas a excepción de un caso, el cúmulo mixto binario $\text{Ag}_2\text{-Cu}_2$, donde el cobre tiene carga negativa ($\text{Cu}(60)=-0.078$).

En el Apéndice I se puede ver un análisis sobre las energías libres de Gibbs para las reacciones de formación de los sistemas de cúmulos mixtos binarios y ternarios con silibina.

○ MAPA DONADOR-ACEPTOR PARA CÚMULOS MIXTOS EN SILIBINA

En la Figura 44 se muestra el mapa donador-aceptor para cúmulos mixtos con silibina. Además de esos datos se agregaron los sistemas Sily- M_4 , ($\text{M}=\text{Cu}, \text{Ag}, \text{Au}$) la astaxantina y los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$. Se utilizó agua como disolvente para modelar un medio polar. En este mapa no se incluyen la silibina desprotonada ni el resveratrol porque sus valores de energía de ionización son prácticamente iguales a los de la silibina y sus afinidades electrónicas son menores, por lo que el análisis sería el mismo que el de la silibina.

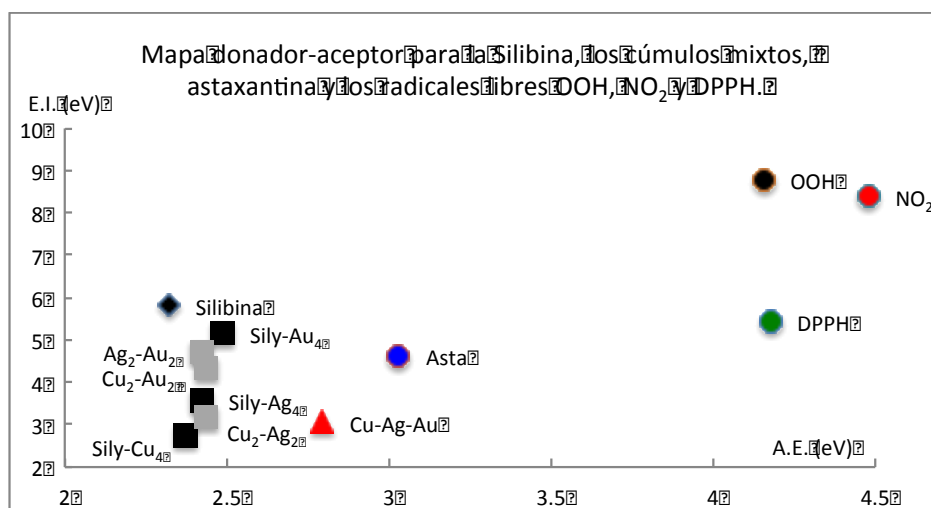


Figura 44. Mapa donador-aceptor para la interacción de cúmulos mixtos con silibina.

Todos los sistemas con metales y silibina mejoran las propiedades antirradicálicas de la silibina. Ninguno de los sistemas mixtos es mejor donador que el sistema Sily-Cu_4 , ni

mejor aceptor que el sistema Sily-Au₄, por lo que la capacidad antirradicálica para el mecanismo de transferencia para los sistemas mixtos binarios queda muy acotada.

El sistema mixto ternario Sily-Cu-Ag-Au tiene mayor afinidad electrónica que los sistemas Sily-M₄ y Sily-[M_{x2}-M_{y2}], por lo que la capacidad de aceptar electrones se ve incrementada. También es mejor donador electrónico que todos los sistemas, salvo Sily-Cu₄. La naturaleza y el tamaño del cúmulo juegan un papel importante en la modulación de las propiedades antirradicálicas de los sistemas de cúmulos metálicos con silibina. Sin embargo, el mejor aceptor de electrones de las moléculas estudiadas para estabilizar los radicales libres •OOH, NO₂• y DPPH• es la astaxantina.

La silibina es incapaz, por su posición en el mapa, de donar electrones al radical libre DPPH• para estabilizarlo, pero todos los sistemas con metales pueden hacerlo. Cualquier sistema en el mapa donador-aceptor puede estabilizar los radicales libres •OOH y NO₂•.

Los cúmulos binarios ofrecen distintas respuestas en términos de donación y acepción de electrones con respecto a los cúmulos de un solo tipo de átomos, por lo que se comprueba que se podrá modular la capacidad antirradicálica de los sistemas unidos a silibina. Esto puede representar un aporte a los datos experimentales, pues se pueden disenar cúmulos para procesos específicos con propiedades electrónicas particulares.

Con los cúmulos mixtos se amplió la gama de posibilidades en cuanto al diseno de sistemas con cúmulos y la respuesta antirradicálica que ofrecen.

- ESPECTROS DE CARACTERIZACIÓN

- ESPECTROS UV-VISIBLE

En la Tabla 15, se presentan los espectros teóricos de UV-visible para los cúmulos mixtos binarios y ternarios con silibina.

Tabla 15. λ_{\max} para silibina y los sistemas de cúmulos binarios y ternarios

Valores λ_{\max} de espectros UV-visible para la interacción de cúmulos mixtos binarios y ternarios		
Estructura		λ_{\max} (nm)
Silibina		269
Binario	Ag ₂ -Au ₂	376
	Au ₂ -Cu ₂	371
	Ag ₂ -Cu ₂	410
Ternario	Ag-Au-Cu	426

Los máximos de absorción se desplazan a mayores longitudes de onda. La presencia de nanopartículas de metales en forma de cúmulos mixtos (Cu, Ag, Au) podría tener una respuesta espectroscópica satisfactoria para detectar adecuadamente silibina.

En la Figura 45 se presentan los espectros teóricos de UV-visible para estos sistemas de cúmulos binarios y ternarios en interacción con silibina.

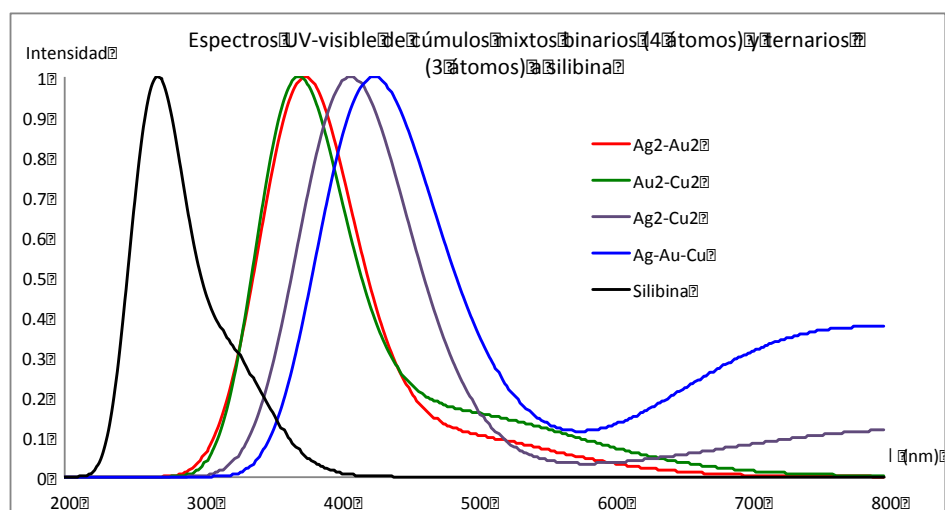


Figura 45. Espectros UV-visible de la interacción de cúmulos binarios y ternarios con silibina.

- ESPECTROS RAMAN

En la Figura 46 se presentan los espectros Raman para los cúmulos mixtos.

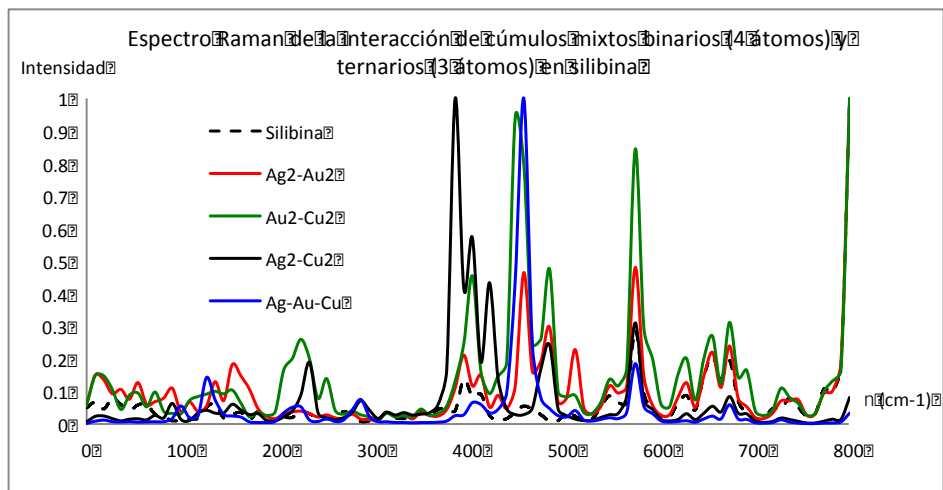


Figura 46. Espectros Raman de la interacción de cúmulos binarios y ternarios con silibina.

Los espectros Raman varían también de forma apreciable. No importa el tipo, la carga o la naturaleza del cúmulo, siempre se intensifican las señales y aparecen picos característicos debido a las diferentes interacciones metal-silibina.

Nuevos picos aparecen cerca de 400 y 460 cm^{-1} propios de la interacción entre el metal y la silibina, pero también un aumento importante en la intensidad del pico en 580 cm^{-1} característico de silibina, lo que sería conveniente para la identificación analítica y de manera sensible de la silibina.

La presencia de cúmulos mixtos cambia la forma de los espectros Raman teóricos de la silibina, lo que supone que experimentalmente se podría esperar una respuesta similar al hacer interactuar nanopartículas combinadas.

○ CONCLUSIONES

INTERACCIÓN DE CÚMULOS DE CUATRO ÁTOMOS METÁLICOS CON SILIBINA

La interacción de los cúmulos con la silibina muestra que las distancias Sily-M (M=Cu, Ag, Au) se encuentran en el rango de interacciones fuertes que presentan además puentes de hidrógeno no convencionales y que se trata de interacciones electrostáticas con cierto carácter covalente.

Los sistemas Sily-M₄, M=(Cu, Ag, Au) son mejores aceptores y donadores de electrones que la silibina. Todos los sistemas Sily-M₄ son capaces de estabilizar los radicales libres •OOH, NO₂• y DPPH•, pero ninguno mejora la capacidad aceptora de la astaxantina.

Los sistemas de cúmulos metálicos con silibina modelados podrían mejorar sensiblemente las propiedades antirradicálicas de la silibina.

Los máximos de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$, se encuentran desplazados hacia mayores longitudes de onda con respecto a la silibina en el espectro teórico de UV-visible, lo que podría ser útil para detectar si se ha llevado a cabo la interacción de los cúmulos metálicos con la silibina.

Los espectros teóricos Raman para este tipo de sistemas muestran un incremento en la intensidad de las señales, por lo que este tipo de sistemas podría ser un método analítico para detectar sensiblemente la silibina.

Para el estudio de la interacción de la silibina con los cúmulos como sistemas cargados se concluyó que mientras que las distancias Sily-M cambian muy poco, los valores de las cargas de Mulliken para el átomo más cercano a la silibina aumentan conforme se incrementa la carga total del sistema y la distribución de carga global presentada en los mapas de potencial electrostático se ve progresivamente modificada, lo que sugiere que la interacción [Sily-M₄]^{x+} (M=Cu,Ag,Au, x=+1 para Cu, Ag y Au, +2 para Cu ó +3 para Au) es de tipo enlazante y que las propiedades electrónicas de la silibina se ven modificadas.

En cuanto a la capacidad antirradicálica analizada con el mecanismo de transferencia electrónica, todos los sistemas cargados [Sily-M₄]^{x+} mejoran la donación y aceptación de electrones de la silibina, y todos mejoran la capacidad de aceptar electrones de sus análogos neutros, pero no en todos los casos la capacidad donadora.

A excepción de los sistemas $[\text{Sily-Au}_4]^+$ y $[\text{Sily-Au}_4]^{3+}$, los sistemas cargados pueden estabilizar $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$. El sistema $[\text{Sily-Ag}_4]^+$ mejora tanto la capacidad donadora como aceptora de la astaxantina, por lo que podría considerarse una buena especie antirradicálica.

Los sistemas de la interacción de cúmulos con silibina se diferencian de la silibina y podrían ser utilizados para detectarla. Sin embargo, $\lambda_{\text{máx}}$ para el sistema $[\text{Sily-Ag}_4]^+$ difiere notablemente del valor experimental, situación que hace pensar que los cúmulos metálicos de cuatro átomos ya se encuentran reducidos en el experimento.

Para los espectros Raman se observa que hay incrementos en las intensidades de los picos, por lo que los sistemas cargados podrían detectar sensiblemente silibina.

INTERACCIÓN DE CÚMULOS MIXTOS BINARIOS Y TERNARIOS CON SILIBINA

El estudio de las geometrías de este tipo de sistema no difiere en gran medida con respecto a la de interacción de cúmulos neutros con silibina.

Todos los sistemas mixtos $\text{Sily}-[\text{M}_{x2}-\text{M}_{y2}]$ y $\text{Sily}-[\text{Cu-Ag-Au}]$ mejoran las propiedades antirradicálicas de la silibina y pueden estabilizar $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$.

La naturaleza y el tamaño del cúmulo podrían jugar un papel importante en la modulación de las propiedades antirradicálicas de los sistemas de cúmulos metálicos con silibina. Los cúmulos mixtos binarios estudiados en esta sección podrían modular la capacidad antirradicálica de los sistemas $\text{Sily}-\text{M}_4$, aunque en rangos muy acotados, mientras que el cúmulo mixto ternario podría hacerlo en rangos más amplios.

Para todos los sistemas mixtos, $\text{Sily}-[\text{M}_{x2}-\text{M}_{y2}]$ y $\text{Sily}-[\text{Cu-Ag-Au}]$, los máximos de absorción se ven desplazados con respecto a la silibina, mientras que los espectros teóricos Raman muestran un incremento en la intensidad de las señales, por lo que podrían ser utilizados para detectar analíticamente y de manera sensible y adecuada la silibina.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Biedermann, D.; Vavrikova, E.; Cvak, L.; Kren, V.; Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 1077-1232.
2. Gaussian 09, Revision A.08, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A. Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M. R.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R. E.; Stratmann, O.; Yazyev, A. J.; Austin, R.; Cammi, C.;
3. Marenich, A.V.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 6378–6396.
4. Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gazak, R.; Hrbáč, J.; Sedmera, P.; Kren, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.L.; et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1054-1063.
5. Borsari, M.; Gabbi, C.; Ghelfi, F.; Grandi, R.; Saladini, M.; Severi, S.; Borella, F. Silybin, a new iron-chelating agent. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 123-129.

6. Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M.A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 9037-9042.
7. Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on electron transfer reactions between carotenoids and free radicals. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 12113-12120.
8. Gyorgy, I.; Antus, S.; Blazovics, A.; Foldiak, G. Substituent effects in the free radical reactions of silybin: radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1992**, *61*, 603-609.
9. Van Wenum, E.; Jurczakowski, R.; Litwinienko, G. Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of enol groups. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 9102-9112.
10. Matisz, G.; Kelterer, A. M.; Fabian, W. M. F.; Kunsági-Máté, S. Coordination of methanol clusters to benzene: a computational study. *J. Phys. Chem. A*, **2011**, *115*, 10556–10564.
11. Meyer, M. M.; Kass, S. R. Experimental and theoretical gas-phase acidities, bond dissociation energies, and heats of formation of HClO_x, s = 1–4. *J. Phys. Chem. A*, **2010**, *114*, 4086–4092.
12. Paukku, Y.; Hill, G. Theoretical determination of one-electron redox potentials for DNA bases, base pairs, and stacks. *J. Phys. Chem. A*, **2011**, *115*, 4804–4810.
13. Hay, P.J.; Wadt, W.R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations-potentials for the transition-metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.*, **1985**, *82*, 270-83.

14. Hay, P.J.; Wadt, W.R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations-potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.*, **1985**, *82*, 299-310.
15. Jug, K.; Zimmermann B.; Calaminici, P.; Koster, A. Structure and stability of small copper clusters, *J. Chem Phys.*, **2002**, *116*, 4497-4507.
16. Fournier, R. Theoretical study of the structure of silver clusters, *J. Chem Phys.*, **2001**, *115*, 2165-2169.
17. Martínez A. Size matters, but is being planar any relevance? Electron Donor Acceptor properties of neutral gold clusters up to 20 atoms, *J. Phys. Chem. C*, **2010**, *114*, 21240-21246.
18. Alokorta, I.; Elguero, J. Non conventional hydrogen bonds, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 163-170.
19. Feller, D.; Glendening E.D.; de Jong, W.A. Structures and binding enthalpies of $M^+(H_2O)_n$ clusters, $M=Cu, Ag, Au$, *J. Chem. Phys.*, **1999**, *110*, 1475.
20. Hernández-Marín, E.; Martínez, A. Carbohydrates and their free radical scavenging capability: A theoretical study. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*(32), 9668-9675.
21. Alonso Vante, N.; Jaegermann, W.; Tributsch, H.; Hoenle, W.; Yvon, K.; Electrocatalysis of oxygen reduction by chalcogenides containing mixed transition metal clusters, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*(11), 3251-3257.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- ❖ Al comparar los espectros teóricos Raman y de UV-visible de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina se concluyó que es posible seguir analíticamente la oxidación de la silibina a su derivado deshidrogenado, la 2,3-dehidrosilibina.
- ❖ La influencia del pH es un factor crucial a tener en cuenta para determinar la capacidad antirradicálica de la silibina, la 2,3-dehidrosilibina y sus derivados pues la capacidad para estabilizar los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$ se ve modificada.
- ❖ Sin importar la naturaleza, la carga o el tamaño de los cúmulos metálicos estudiados en interacción con la silibina, se producen cambios significativos en los espectros Raman y UV-visible que sugieren que estos sistemas podrían utilizarse para la detección analítica y de manera sensible de silibina.
- ❖ La gran mayoría de los sistemas de interacción de cúmulos metálicos con silibina analizados mejoran sus propiedades antirradicálicas considerando el mecanismo de transferencia electrónica, pues la capacidad para donar y aceptar electrones es mayor.
- ❖ Los sistemas formados por cúmulos metálicos y silibina atrapan satisfactoriamente los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$.

Con base en las discusiones llevadas a cabo con los distintos miembros del jurado, y para enriquecer este trabajo, se presentan a continuación los apéndices A a I con el fin de responder a las diversas inquietudes planteadas.

APÉNDICE A

ANTECEDENTES DE MECÁNICA CUÁNTICA

La química cuántica es fundamental para el estudio de la estructura electrónica en átomos, moléculas y sistemas en fase condensada. La obtención de resultados confiables de parámetros geométricos, electrónicos, cinéticos y de reactividad se debe a las constantes mejoras en los modelos utilizados para el estudio de los sistemas en cuestión. En esta sección se presentan de manera resumida los antecedentes de mecánica cuántica para después abordar el modelo de la Teoría de Funcionales de la Densidad utilizado en este trabajo.

○ ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER

La ecuación matemática de Erwin Schrödinger propuesta en 1926 supone un hito en la historia de la física moderna al describir la evolución de una partícula microscópica a través del tiempo. La ecuación de Schrödinger unidimensional dependiente del tiempo tiene la forma:

$$i\hbar \frac{\partial \psi(x, t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \psi(x, t)}{\partial x^2} + V(x)\psi(x, t) \quad (1)$$

La función de onda, ψ , no tiene un significado físico y su valor puede ser complejo o negativo; sin embargo la interpretación estadística de la función de onda realizada por Max Born sí tiene un significado físico. El término $|\psi|^2$ es real y positivo y representa la densidad de probabilidad de encontrar la partícula en un espacio determinado. La ecuación de Schrödinger puede plantearse como independiente del tiempo de la siguiente manera:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + V\psi = E\psi \quad (2)$$

La ecuación de Schrödinger es una ecuación diferencial de segundo orden pues se involucra la función de onda, ψ , y su segunda derivada. En la escritura misma de la ecuación de Schrödinger se puede apreciar la característica dual de las partículas a nivel microscópico pues la ecuación involucra términos asociados a las ondas y a la masa. Además, el operador de energía total o hamiltoniano, \hat{H} , describe la energía cinética y potencial del sistema como se indica a continuación.

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} + V \quad (3)$$

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para una partícula en una dimensión puede finalmente escribirse como:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (4)$$

De esta forma se hace explícito que la ecuación de Schrödinger es una ecuación de valores propios. La función de onda, ψ , de un sistema es una función propia del operador hamiltoniano, cuyo valor propio E es la energía total.

○ APROXIMACIÓN DE BORN-OPPENHEIMER

Para describir las propiedades de una molécula, es necesario considerar la construcción del hamiltoniano para un sistema poliatómico (varias partículas interactuando). Se consideran los núcleos y los electrones como partículas puntuales con carga y masa. La ecuación de Schrödinger se expresa como:

$$\hat{H}\psi(q_i, q_\alpha) = E\psi(q_i, q_\alpha) \quad (5)$$

Con q_i y q_α como coordenadas electrónicas y nucleares respectivamente.

El hamiltoniano por su parte se escribe como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 + \sum_{\alpha} \sum_{\beta > \alpha} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e^2}{r_{\alpha\beta}} - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{i\alpha}} + \sum_i \sum_{i > j} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (6)$$

Donde α y β se refieren a los núcleos, mientras que i y j denotan a los electrones. El hamiltoniano consta de cinco términos, los dos primeros corresponden a la energía cinética de núcleos y electrones respectivamente. El tercer término corresponde a la energía potencial de repulsión electrostática entre los núcleos con números atómicos Z_{α} y Z_{β} y separados por la distancia $r_{\alpha\beta}$. El cuarto término se refiere a la energía potencial de atracción electrostática entre núcleos y electrones separados por una distancia $r_{i\alpha}$; mientras que el quinto término corresponde a la energía potencial de repulsión entre electrones separados por una distancia r_{ij} .

Debido a que la masa de los núcleos es 1836 veces mayor que la de los electrones ($m_{\alpha} \gg m_e$), se puede considerar el sistema molecular como constituido por núcleos estáticos y electrones móviles. De esta forma la energía cinética de los núcleos (primer término del hamiltoniano) se puede omitir, a esto se le conoce como la aproximación de Born-Oppenheimer. La consecuencia de la aproximación de Born-Oppenheimer es que se pueda reescribir el hamiltoniano del sistema como un hamiltoniano electrónico más una contribución de repulsión electrostática de los núcleos.

$$\hat{H}_{ee} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{i\alpha}} + \sum_i \sum_{i > j} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad (7) \quad \text{y} \quad V_{NN} = \sum_{\alpha} \sum_{\beta > \alpha} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e^2}{r_{\alpha\beta}} \quad (8)$$

De esta forma la ecuación de Schrödinger ahora se escribe como

$$(\hat{H}_{ee} + V_{NN})\psi_{ee} = U\psi_{ee} \quad (9)$$

Donde U es la suma de la energía electrónica y la energía potencial de repulsión electrostática entre los núcleos. Si las coordenadas de los núcleos no varían, las distancias internucleares tampoco y entonces el término V_{NN} es una constante para una configuración nuclear dada. De esta forma, con resolver la ecuación electrónica es posible resolver la conformación molecular. La ecuación para calcular la contribución puramente electrónica se escribe como:

$$\hat{H}_{ee}\psi_{ee} = E_{ee}\psi_{ee} \quad (10)$$

○ PRINCIPIO VARIACIONAL

No hay una solución analítica de la ecuación de Schrödinger para el problema de más de dos cuerpos, por lo que hay que utilizar soluciones aproximadas. El método variacional que se basa en el principio variacional es una buena herramienta para estados estacionarios.

El principio variacional establece que dado un sistema de hamiltoniano, \hat{H} , si Φ es cualquier función normalizada de prueba que se comporte bien y satisfaga las condiciones límite del problema, entonces:

$$\int \phi^* \hat{H} \phi d\tau \geq E_0 \quad (11)$$

Donde E_0 es el valor propio más bajo posible de \hat{H} . Esto quiere decir que cualquier función normalizada va a proporcionar un valor esperado de la energía mayor o igual que el valor exacto de la energía del estado fundamental. Esto se demuestra concibiendo un sistema arbitrario al que al operador \hat{H} le correspondan funciones propias, ψ_j , y valores propios, E_j , tales que:

$$\hat{H}\psi_j = E_j\psi_j \quad (12)$$

Además, ϕ una función normalizada que depende de las variables en las que opera \hat{H} y que satisface las mismas condiciones de frontera que ψ_j . De esta forma ϕ se puede expresar como

$$\phi = \sum_j c_j \psi_j \quad (13)$$

Donde las funciones ψ_j son ortonormales:

$$\int \psi_j^* \psi_j d\tau = \delta_{ij} \quad (14)$$

Por lo tanto el valor esperado de \hat{H} correspondiente a ϕ es:

$$E_\phi = \int \phi^* \hat{H} \phi d\tau \quad (15)$$

Al sustituir $\phi = \sum_j c_j \psi_j$ en $E_\phi = \int \phi^* \hat{H} \phi d\tau$ se obtiene:

$$E_\phi = \sum_{ij} c_i^* c_j E_j \delta_{ij} = \sum_j c_j^* c_j E_j = \sum_j |c_j|^2 E_j \quad (16)$$

Sean $E_0 \leq E_1 \leq E_2$, donde E_0 es la energía del estado basal. Por lo tanto, la energía de prueba es:

$$E_{\phi} = \sum_j |c_j|^2 E_0 \quad (17)$$

Y dado que se encuentra normalizada:

$$\sum_j |c_j|^2 = 1 \quad (18)$$

Finalmente se obtiene la expresión del principio variacional:

$$E_{\phi} \geq E_0 \quad (19)$$

Para resolver el problema de más dos cuerpos se han desarrollado modelos para calcular la energía electrónica, E_{ee} . El primero de estos modelos para el estudio de estructura electrónica es la aproximación de Hartree-Fock (HF), que se basa en la función de onda y cuya principal virtud es tomar en cuenta el intercambio electrónico de manera exacta. Más adelante se desarrollaron los métodos post Hartree-Fock, basados también en la función de onda, que además de tomar en cuenta el intercambio electrónico, consideran también la energía de correlación electrónica. La correlación es el fenómeno debido a la interacción entre partículas cargadas al moverse. El movimiento de cada partícula, en este caso de cada electrón, se encuentra correlacionado con todos los demás en el sistema. Todos los métodos basados en el modelo de Hartree-Fock tienen como variable la función de onda, lo que significa que se describe cada electrón.

La Teoría de Funcionales de la Densidad es un método en el que la cantidad fundamental es la densidad electrónica. Esto tiene algunas ventajas comparado con la función de onda. La densidad electrónica es un observable experimental y, desde el punto de vista computacional, la densidad electrónica depende de tres coordenadas espaciales, mientras que la función de onda depende de las coordenadas de cada una de las N partículas que componen el sistema.

APÉNDICE B

MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE ÁTOMO DE HIDRÓGENO PARA LA SILIBINA Y LA 2,3-DEHIDROSILIBINA

Uno de los mecanismos más importantes para estabilizar radicales libres en los compuestos flavonoides es la transferencia de átomo de hidrógeno. En este mecanismo, la molécula antirradicálica dona un átomo de hidrógeno al radical libre con la finalidad de estabilizarlo, es decir:



Donde *anti* es la molécula antirradicálica, $R\bullet$ representa el radical libre, RH el radical libre unido a un átomo de hidrógeno y entonces estabilizado y $+ anti_{(-H)}\bullet$ la molécula antirradicálica que ha perdido un átomo de hidrógeno.

La manera cuantitativa de medir qué tan eficaz puede ser este mecanismo es analizar la energía de disociación de la molécula antirradicálica para un átomo de hidrógeno, según el siguiente esquema



La diferencia de energía se calcula como:

$$\Delta E = [E_{(H)} + E_{anti_{(-H)}\bullet}] - E_{(anti)} \quad (3)$$

Trouillas *et al.*¹ llevan a cabo este estudio en la silibina y la 2,3-dehidrosilibina únicamente para los cinco grupos hidroxilo y señalan que para la silibina, el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno es secundario para estabilizar radicales libres comparado con la transferencia electrónica y con la formación de aductos. También se afirma que el mecanismo principal para la 2,3-dehidrosilibina es precisamente la transferencia de átomo de hidrógeno.

En este trabajo se completa el estudio, pues se retiraron de forma sistemática todos los átomos de hidrógeno que fueran susceptibles de ser estabilizados químicamente. Para ello se partió de las estructuras más estables de silibina y 2,3-dehidrosilibina, se removieron uno a uno los hidrógenos de cada molécula y se llevó a cabo la optimización de los sistemas con el nivel de teoría M06/6-31+G(d). Se realizó un análisis de frecuencias y se descartó la existencia de frecuencias imaginarias para corroborar que las geometrías obtenidas del cálculo correspondieran a un mínimo de energía.

En las Figuras 1 y 2 se presentan los resultados del estudio, en negritas se señala el átomo de hidrógeno cuya energía de disociación es menor (en eV), lo que significa que ese átomo de hidrógeno puede disociarse del sistema orgánico con mayor facilidad.

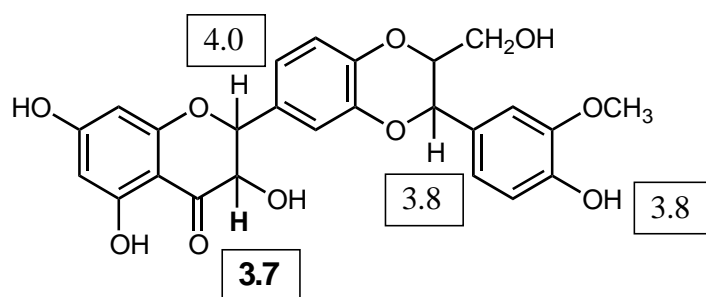


Figura 1. Representación esquemática de la silibina con las energías de disociación más bajas para el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno.

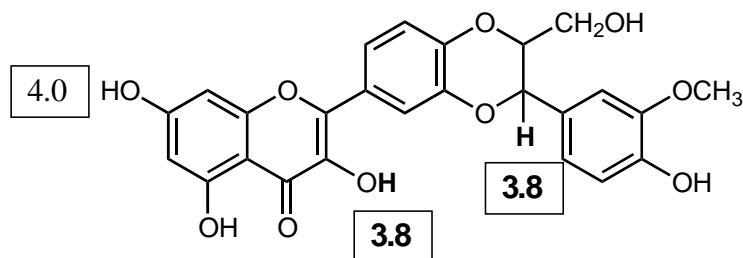


Figura 2. Representación esquemática de la 2,3-dehidrosilibina con las energías de disociación más bajas para el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno.

Los resultados son consistentes numéricamente con respecto a lo anteriormente reportado¹, y se encuentran sitios aún más reactivos que los señalados por Trouillas.

Sin embargo, no se puede considerar que el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno sea el mecanismo principal para inhibir radicales libres ni para la silibina ni para la 2,3-dehidrosilibina.

Los valores en el cambio de energía para la reacción de transferencia de átomo de hidrógeno son termodinámicamente no favorecidos. Además, son mayores que los que se encuentran reportados para moléculas que ofrecen buena respuesta antirradicálica como los sistemas carotenoides².

BIBLIOGRAFÍA

1. Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gazak, R.; Hrbác, J.; Sedmera, P.; Kren, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.L.; Walterová, D. Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A*. **2008**, *112*, 1054-1063.
2. Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M.A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 9037-9042.

APÉNDICE C

COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS Y DE LOS MÁXIMOS DE ABSORCIÓN DE UV-VISIBLE PARA LA SILIBINA CON DIFERENTES METODOLOGÍAS

Se llevó a cabo la comparación de los espectros teóricos de UV-visible y de los máximos de absorción de la silibina con dos metodologías distintas y se compararon los λ_{max} con el valor experimental.

En la sección “Estudio de silibina, 2,3-dehidrosilibina y sus derivados metilados” se presentó el λ_{max} de la silibina utilizando la Teoría de Funcionales de la Densidad dependiente del tiempo con el nivel de teoría M06/6-31+G(d). Sin embargo, se encuentra reportado que el funcional CAM-B3LYP es más adecuado para obtener estados excitados, por lo que a partir de la estructura optimizada se realizó un cálculo a geometría fija utilizando el funcional CAM-B3LYP para obtener el espectro teórico¹.

En la Figura 1 se muestran los espectros teóricos de la silibina y en la Tabla 1 un cuadro comparativo con los valores λ_{max} teóricos y experimental.

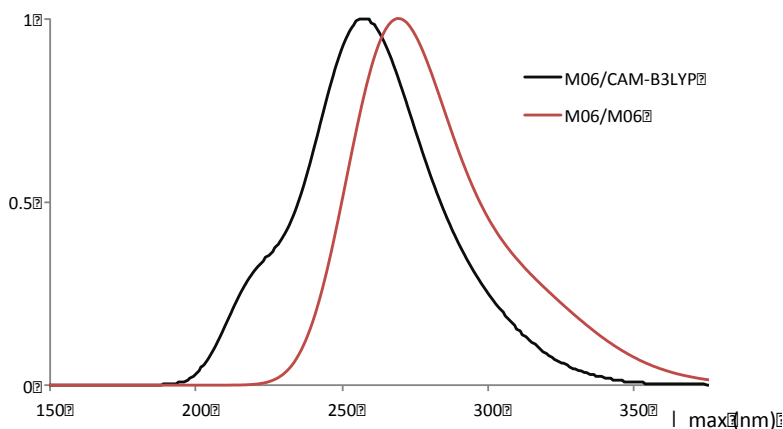


Figura 1. Comparación de los espectros teóricos de UV-visible para la silibina.

Tabla 1. Máximos de absorción en los espectros teóricos de UV-visible para la silibina.

Silibina	λ_{max} (nm)
Calculada - M06	269 (5.0 % diferencia)
Calculada - CAM-B3LYP	257 (9.2 % diferencia)
Experimental	283

De acuerdo con los resultados de la Tabla 1, el funcional CAM-B3LYP no mejora en mucho la descripción antes presentada con el funcional M06. Existe una mayor diferencia con respecto al valor de $\lambda_{\text{máx}}$ experimental cuando se utiliza el funcional CAM-B3LYP (9.2% diferencia) que cuando se utiliza el funcional M06 (5.0% diferencia).

BIBLIOGRAFÍA

1. Yanai, T.; Tew, D.P.; Handy, N.C. A new hybrid Exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Letters*, **2004**, *393*, 51-57.

APÉNDICE D

ESTUDIO DE LOS VALORES DE LAS FUNCIONES DE FUKUI PARA EL ATAQUE RADICÁLICO EN LA SILIBINA

El estudio de reactividad local que puede emplearse para conocer los sitios más propensos para que se lleven a cabo ataques radicálicos en una molécula es el análisis de los valores de las funciones de Fukui para el ataque radicálico¹. La función de Fukui para el ataque radicálico se expresa según la ecuación:

$$f_{Ak}^{\circ} = \frac{1}{2}(q_{Ak}(N_A + 1) - q_{Ak}(N_A - 1)) \quad (1)$$

Donde f_{Ak}° es el valor de la función de Fukui del átomo Ak , $q_{Ak}(N_A + 1)$ representa la carga del átomo Ak de la especie aniónica y $q_{Ak}(N_A - 1)$ es la carga del átomo Ak de la especie catiónica. Para que los valores de las funciones de Fukui tengan un significado físico deben ser positivos, y estar comprendidos en el intervalo de 0 a 1¹. Cuanto mayor sea el valor de la función de Fukui para un átomo dado, más susceptible será de llevarse a cabo el ataque radicálico en ese átomo¹.

El interés de obtener los valores de las funciones de Fukui para el ataque radicálico para la silibina es compararlos con el estudio de la formación de aductos de la silibina con el radical superóxido, •OOH.

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la misma metodología que para la primera parte de este trabajo “Estudio de silibina, 2,3-dehidrosilibina y sus derivados metilados”, es decir el funcional M06 y la base 6-31+G(d). El estudio se llevó a cabo calculando las especies catiónicas y aniónicas a geometría fija a partir de la estructura optimizada de la silibina y utilizando las cargas de Mulliken, de Hirshfeld² y de Orbitales Naturales de Enlace^{3,4}.

En la Figura 1 se presenta la molécula de silibina numerada, mientras que en la Tabla 1 se muestran los primeros diez valores de las funciones de Fukui para el ataque radicálico con cada una de las cargas utilizadas.

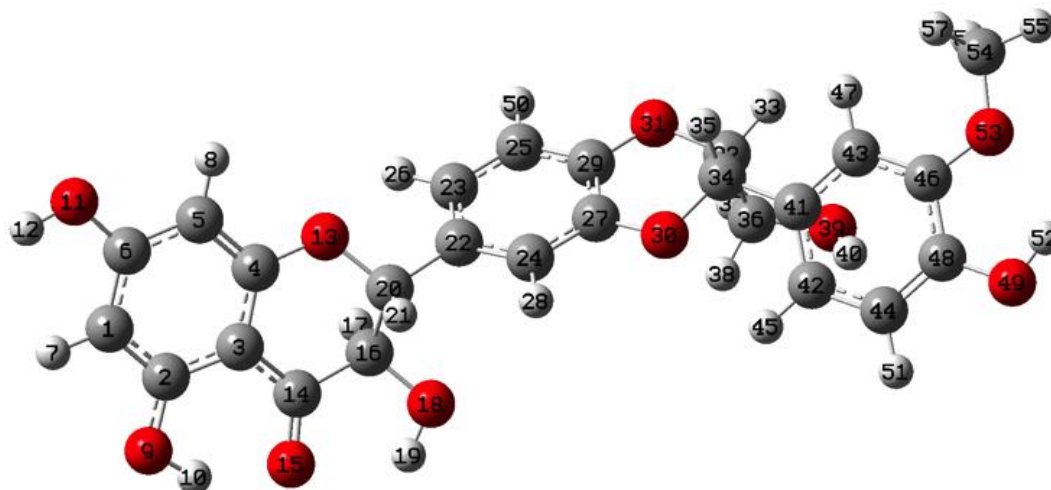


Figura 1. Estructura de la silibina numerada

Tabla 1. Valores de la función de Fukui para el ataque radicalico

Mulliken		Hirshfeld		Orbital Natural de Enlace	
Átomo	f_{Ak}^o	Átomo	f_{Ak}^o	Átomo	f_{Ak}^o
C22	0.127	O15	0.062	C14	0.097
O15	0.091	C14	0.059	O15	0.073
C2	0.088	C6	0.040	C6	0.050
C41	0.079	O9	0.034	C2	0.040
C1	0.071	O11	0.031	O31	0.039
C44	0.064	C1	0.030	O9	0.038
C3	0.064	C2	0.030	C29	0.038
C34	0.063	O31	0.030	C4	0.036
C27	0.061	O49	0.030	C48	0.033
C24	0.056	C5	0.029	O49	0.033

Para los distintos tipos de cargas, los valores de las funciones de Fukui para el ataque radicalico son muy cercanos a cero. No existe una consistencia entre los valores más altos de las funciones de Fukui y el orden de los átomos susceptibles de ser atacados por un radical libre; además, el orden de predicción para el ataque radicalico cambia según el tipo de carga analizada.

Comparando estos resultados con los de la formación del aducto [Silibina-OOH•], no existe para ninguno de los tipos de carga analizados una consistencia que permita afirmar que la obtención de los valores de las funciones de Fukui pudiera servir como una herramienta de predicción para estos sistemas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Méndez, F.; Gázquez, J.L. Chemical reactivity of enolate ions: The local hard and soft acids and bases principle viewpoint. *J. Am. Soc.* **1994**, *116*, 9298-9301
2. Hirshfeld, F.L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities, *Theor. Chem. Acc.*, **1977**, *44*, 129-138.
3. Foster, J.P.; Weinhold, F. Natural hybrid orbitals. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7211-7218.
4. Reed, A.E.; Weinhold, F. Natural bond orbital analysis of near Hartree-Fock water dimer. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 4066-4073

APÉNDICE E

TEORÍA DE ÁTOMOS EN MOLÉCULAS DE RICHARD BADER

En la descripción de la interacción de los cúmulos metálicos con la silibina se realiza un análisis topológico y se utiliza el Laplaciano de la densidad electrónica sin ahondar en la parte conceptual de la teoría de átomos en moléculas de Richard Bader. Este apéndice tiene la finalidad de presentar muy brevemente los aspectos más importantes de dicha teoría para el análisis que se llevó a cabo.

En el lenguaje del análisis topológico, los puntos en los que la norma del gradiente de la función son cero se llaman puntos críticos. Los puntos críticos se clasifican en cuatro tipos dependiendo de la cantidad de eigenvalores negativos que aparecen en la matriz Hessiana.

(3,-3). Los tres eigenvalores de la matriz Hessiana son negativos y estos puntos son máximos locales. Para el análisis de la densidad electrónica, los puntos (3,-3) corresponden a las posiciones nucleares.

(3,-1) Dos de los eigenvalores de la matriz Hessiana son negativos y para el análisis de la densidad electrónica, los puntos críticos (3,-1) corresponden a pares de átomos atractivos por lo que se conocen como puntos críticos de enlace. El valor de la función real en un punto crítico de enlace tiene gran significado físico. Por ejemplo, el Laplaciano de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho$, está relacionado con la fuerza y orden de enlace por lo que se convierte en un descriptor topológico interesante.

(3,+1) Uno de los eigenvalores de la matriz Hessiana es negativo. En el análisis de la densidad electrónica este tipo de puntos se encuentra en el centro de un anillo. Los puntos (3,+1) se conocen como puntos críticos de anillo.

(3,+3) Ninguno de los eigenvalores de la matriz Hessiana es negativo y estos puntos son mínimos locales. Para el análisis de la densidad electrónica, estos puntos aparecen en los centros de cajas.

En este trabajo se analizaron los puntos críticos de enlace (3,-1) con el Laplaciano de la densidad electrónica.

1. Bader, R.F.W. Atoms in molecules: A Quantum Theory. Clarendon Press Oxford, **1994**.

APÉNDICE F

CÁLCULO DEL CÚMULO DE Ag PARA LAS MULTIPLICIDADES 1, 3 Y 5 CON EL FUNCIONAL M05-2X

Una de las inquietudes planteadas con respecto a la metodología utilizada para la interacción de cúmulos de Cu, Ag y Au con silibina es la utilización del funcional B3LYP, pues no toma el carácter multirreferencial de los átomos metálicos. Una alternativa para esta situación es la utilización del funcional M05-2X¹ pues se encuentra parametrizado de tal manera que resuelve esta situación. Se llevaron a cabo los cálculos de los cúmulos de cuatro átomos de Ag con el funcional M05-2X y el pseudopotencial LanL2DZ, con el objetivo de verificar el orden energético. Se incluyó además la comparación de los cúmulos en fase gas y el efecto del agua como disolvente con el método SMD.

En la Figura 1 se presentan los resultados de dicho estudio para el cúmulo de cuatro átomos de Ag.

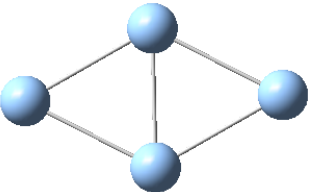
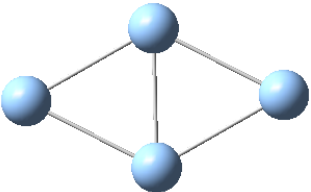
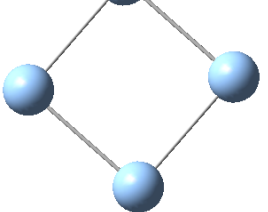
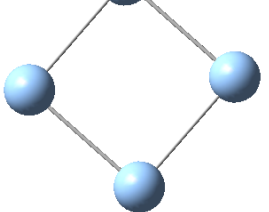
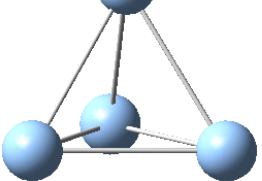
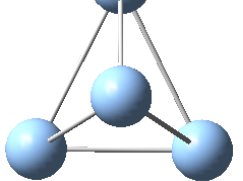
Multiplicidad	Estructura	
	Fase gas	Agua como disolvente
1	ΔE (Kcal/mol) 0.0 	ΔE (Kcal/mol) 0.0 
3	19.4 	22.4 
5	93.1 	151.2 

Figura 1. Diferencia de energía de los cúmulos de cuatro átomos de Ag con respecto a la multiplicidad.

Utilizando el funcional M05-2X se obtiene el mismo orden de energías para los cúmulos de cuatro átomos de Ag que cuando se optimiza con el funcional B3LYP, esto quiere decir que la estructura más estable para el cúmulo de Ag es cuando la multiplicidad es igual a uno. Sin importar que la optimización del cálculo se llevara a cabo en fase gas o simulando un medio polar como el agua, ni el orden de energías ni las geometrías de los cúmulos parecen variar.

Como conclusión de este estudio se puede afirmar que aunque exista cierto carácter multiconfiguracional en el funcional B3LYP, éste parece no afectar los resultados de estabilidad para los cúmulos estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhao, Y.; Schultz, N.E.; Truhlar, D.G. Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions, *J. Chem. Theory and Comput.*, **2006**, 2, 364-82.

APÉNDICE G

COMPARACIÓN DE LAS ENERGÍAS DE IONIZACIÓN Y AFINIDADES ELECTRÓNICAS PARA EL SISTEMA Sily-Cu₄ EN FASE GAS Y UTILIZANDO AGUA COMO DISOLVENTE EN EL MÉTODO SMD.

Un punto interesante a tener en cuenta es que el mecanismo de transferencia electrónica de la silibina interacciona con cúmulos metálicos para estabilizar radicales libres y se piensa que se lleva a cabo en disolución acuosa, por lo que podría ser de utilidad estudiar el comportamiento de dichos sistemas utilizando un método de cálculo que tome en cuenta la presencia del disolvente. Se escogió el sistema Sily-Cu₄ y se llevó a cabo el cálculo de la optimización utilizando el funcional B3LYP, la base 6-31+g(d) para los átomos de H, C y O y el pseudopotencial LanL2DZ para los átomos de cobre, y tomando en cuenta la presencia de agua gracias al modelo SMD. Después, se llevó a cabo un cálculo a geometría fija con la base expandida 6-311+G(d,p).

En la Tabla 1 se presenta un cuadro comparativo de las energías de ionización y afinidades electrónica en eV para el sistema optimizado en fase gas y con el disolvente.

Tabla 1. Energías de ionización y afinidades electrónicas del sistema Sily-Cu₄ en fase gas y tomando en cuenta el disolvente

Sistema	Fase gas		Disolvente agua	
	E.I.	A.E.	E.I.	A.E.
Sily-Cu ₄	2.75	2.37	2.80	2.44

Las energías de ionización y afinidades electrónicas presentadas en la Tabla 1 varían poco de acuerdo con la metodología utilizada. Para la energía de ionización la variación es de 1.8%, mientras que para la afinidad electrónica hay diferencia de 2.9%. Se observa además la misma tendencia, es decir que en ambos casos la energía de ionización y la afinidad electrónica son mayores cuando el cálculo se optimizó tomando en cuenta el agua como disolvente.

Estos resultados ayudan a validar la metodología utilizada para el estudio de la interacción de la silibina con cúmulos metálicos.

APÉNDICE H

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE UN CÚMULO DE CUATRO ÁTOMOS DE Cu CON SILIBINA DESPROTONADA

A pH fisiológico la silibina se encuentra en mayor medida protonada; sin embargo, existe 26.30% de la especie química desprotonada. Como se demostró en la sección “Estudio de silibina, 2,3-dehidrosilibina y sus derivados metilados”, la silibina desprotonada mejora la capacidad donadora de la silibina para el mecanismo de transferencia electrónica. Esto quiere decir que la silibina desprotonada tiene una menor energía de ionización que la silibina. Además en la sección “Interacción de cúmulos de cuatro metálicos con silibina” se analizó que la interacción de cúmulos metálicos mejoraba sensiblemente las capacidades antirradicálicas de la silibina, y sobre todo se observaba un incremento considerable en la capacidad donadora del sistema [Sily-Cu₄].

De esta forma se explica la necesidad de incluir en este estudio la silibina desprotonada interactuando con el cúmulo metálico de Cu. El sistema [Sily⁽⁻⁾-Cu₄] se optimizó con la misma metodología utilizada para estudiar la interacción de los cúmulos metálicos con silibina, es decir el funcional B3LYP, el pseudopotencial LanL2DZ para los átomos de Cu y la base 6-31+G(d) para los demás átomos del sistema. A partir de la estructura optimizada se llevó a cabo el cálculo a geometría fija del catión y del anión con la base expandida 6-311+G(d,p) e incluyendo los efectos del disolvente agua por el método SMD.

En la Figura 1 se presenta la estructura optimizada del sistema [Sily⁽⁻⁾-Cu₄], mientras que en la Figura 2 se muestra el mapa donador-aceptor que permite la comparación entre la silibina, la silibina desprotonada [Sily-Cu₄], [Sily-Cu₄]⁺, [Sily-Cu₄]²⁺ y la especie de interés [Sily⁽⁻⁾-Cu₄]. Se incluyen además el radical libre DPPH• y las moléculas de astaxantina y resveratrol.

A diferencia de lo que se presenta en el resto de este trabajo de investigación, la adición del cúmulo metálico no se llevó a cabo en el sitio entre el grupo hidroxilo R₃ y el carbonilo del anillo C, sino en el lugar donde se lleva a cabo la desprotonación de la silibina, es decir, en el grupo hidroxilo R₇. Esta elección se debe a que se consideró como un sitio de interacción posible e interesante.

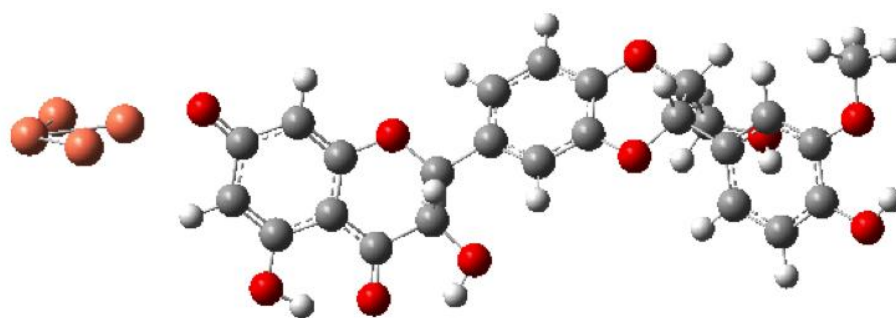


Figura 1. Estructura optimizada [Sily⁽⁻⁾-Cu₄].

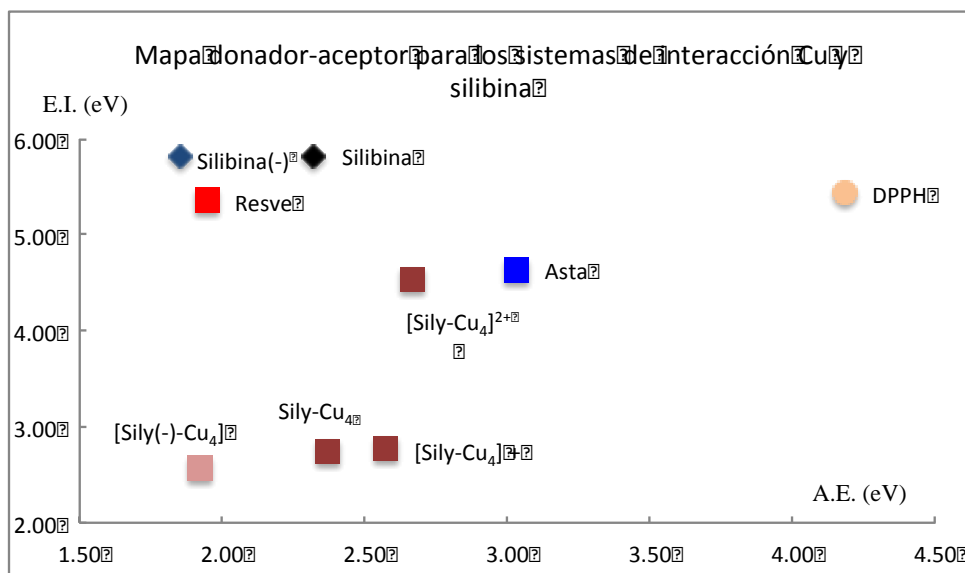


Figura 2. Mapa donador-aceptor para el estudio de la especie [Sily⁽⁻⁾-Cu₄].

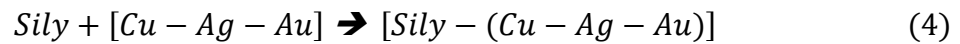
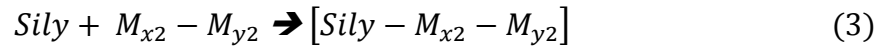
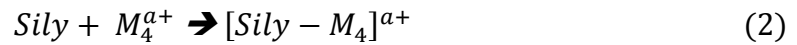
La especie de interés [Sily⁽⁻⁾-Cu₄] tiene la menor energía de ionización de todos los sistemas en el mapa donador-aceptor de electrones, en ese sentido mejora la capacidad de donación electrónica de la silibina y de todas las especies de silibina con cobre hasta ahora estudiadas. Al mismo tiempo, se puede afirmar que la capacidad de [Sily⁽⁻⁾-Cu₄] para aceptar electrones es baja puesto que tiene la afinidad electrónica más pequeña de todos los sistemas en el mapa. [Sily⁽⁻⁾-Cu₄] es capaz de estabilizar al radical libre •DPPH.

Como perspectiva de este trabajo, sería interesante estudiar el comportamiento de la capacidad antirradicálica de la 2,3-dehidrosilibina como un sistema desprotonado que interacciona con cúmulos metálicos.

APÉNDICE I

ENERGÍAS LIBRES DE GIBBS PARA LA REACCIÓN DE FORMACIÓN DE LOS CÚMULOS CON SILIBINA

La manera cuantitativa de conocer qué tan estable es la formación de los sistemas $Sily-M_4$, $[Sily-M_4]^{a+}$ (con $M=Cu, Ag$ ú Au ; y $a= 1, 2$ y 3 dependiendo del metal), $Sily-[M_{x2}-M_{y2}]$ (con x y $y =Cu, Ag$ y Au , x y y diferentes) y $Sily-[Cu-Ag-Au]$ es obteniendo la energía de formación libre de Gibbs, según los esquemas,



Donde el cambio en energía se expresa siempre de la misma manera,

$$\Delta G = G_{(productos)} - G_{(reactivos)} \quad (5)$$

La información de este análisis provee de manera cuantitativa una medida de qué tan fuertemente enlazados se encuentran los distintos cúmulos a la silibina. En la Tabla 1 se presentan estos resultados. Las energías libres de Gibbs se utilizan comúnmente para analizar este tipo de reacciones¹.

Tabla 1. Energías libres de Gibbs para la reacción de formación de los cúmulos con silibina

Sistema	ΔG (Kcal/mol)
Sily-Cu ₄	9.45
Sily-Ag ₄	18.77
Sily-Au ₄	10.36
[Sily-Cu ₄] ⁺	-15.40
[Sily-Cu ₄] ²⁺	-70.10
[Sily-Ag ₄] ⁺	-1.30
[Sily-Au ₄] ⁺	-16.41
[Sily-Au ₄] ³⁺	-273.47
[Sily-(Cu ₂ -Ag ₂)]	11.03
[Sily-(Cu ₂ -Au ₂)]	10.44
[Sily-(Ag ₂ -Au ₂)]	17.37
[Sily-(Cu-Ag-Au)]	8.46

Para los sistemas [Sily-M₄] los valores ΔG de formación indican que es una situación de mayor estabilidad tener por separado el cúmulo metálico de la silibina. Los valores positivos muestran que la formación es un proceso endergónico, es decir termodinámicamente no favorecido y que no se lleva a cabo de manera espontánea. El equilibrio químico se encuentra favorecido hacia reactivos. Se podría concluir que el cúmulo no interactúa de manera enlazante con la silibina para este tipo de sistemas.

Para los sistemas [Sily-M₄]^{a+}, los valores ΔG de formación cambian de signo. Se trata ahora de procesos exergónicos que varían en magnitud directamente con el aumento de la carga. Para todos los sistemas cargados, las estructuras [Sily-M₄]^{a+} se encuentran termodinámicamente favorecidas. Se podría concluir para estos sistemas que la interacción es de tipo enlazante.

Para los cúmulos mixtos binarios y ternarios, los valores de ΔG de formación son positivos, con lo que el análisis es idéntico que para los sistemas [Sily-M₄].

BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez, A.; Galano, A.; Vargas, R.J. Free radical scavenger properties of mangostin: thermodynamics and kinetics of HAT and RAF mechanisms. *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*, 12519-12598.

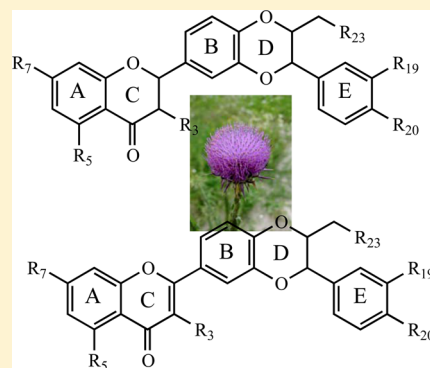
Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Flavonolignans as Free Radical Scavengers

Miguel Reina and Ana Martínez*

Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510 Coyoacán, México DF, México

Supporting Information

ABSTRACT: The electronic properties of six derivatives of silybin (characterized by the absence of the 2,3 double bond) and six derivatives of 2,3-dehydrosilybin (characterized by the presence of the 2,3 double bond) have been studied by applying density functional theory to fully understand the free radical scavenger's mechanism for action and the relationship between reactivity and chemical structure. Optimized geometries, Raman spectra, and λ_{\max} values are reported, enabling us to characterize the systems. These spectra may be useful for monitoring the oxidation between silybin and 2,3-dehydrosilybin, thus providing important experimental information. The relative abundance of deprotonated species under physiological conditions is also reported. Under physiological conditions (pH 7.4), ~70% of silybin is protonated, but 60% of 2,3-dehydrosilybin is deprotonated. The free radical scavenger capacity is analyzed in terms of two mechanisms: electron transfer and adduct formation. Deprotonated molecules are better electron donors and worse electron acceptors than non-deprotonated species. The conclusions derived from this investigation completely concur with previous experimental results. The free radical scavenging activity of 2,3-dehydrosilybin derivatives is higher than that for silybin derivatives. What was not previously considered was the importance of the deprotonated species, which is remarkable and may be important for future experiments.



INTRODUCTION

Herbal drugs have been used for a long time for the treatment of a number of diseases, especially in Eastern medicine.¹ One of these medicinal plants, consumed for decades, is *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae).² This is due to its capacity to prevent hepatic disorders³ in the treatment of alcoholic cirrhosis⁴ because it acts as an antidote to acute mushroom poisoning⁴ and imposes potent antiinflammatory activity.⁵ The active component of this plant is extracted from the seeds and is known as silymarin.⁶ The antioxidant properties of silymarin have been reported in vitro and in animal studies.^{3–8} Silymarin is able to scavenge free radicals and manifests antitumor activity against human tumors (for example, prostate and ovary)⁹ and may also help to protect against nicotine-induced cytotoxicity.¹⁰ Silymarin represents a unique mixture of flavonoids, with silybin constituting the principal active component (Figure 1)

It is already known that flavonoids and related molecules represent good free radical scavengers.^{11–22} The relationship between the structure and the capacity to scavenge free radicals of several flavonoids has been established. In particular, for silybin and 2,3-dehydrosilybin (Figure 1), as for some derivatives, the mechanism to act as radical scavengers has been extensively studied, both experimentally and theoretically by Trouillas et al.¹⁴ Authors reveal the importance of OH groups and the differences in free radical scavenger capacity for silybin and 2,3-dehydrosilybin. They conclude for silybin and its derivatives that the hydrogen atom transfer mechanism is less

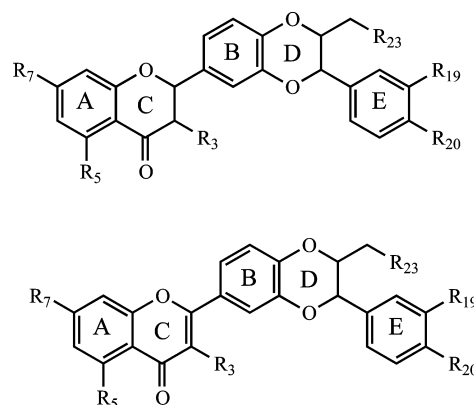


Figure 1. Chemical structures for compounds under study are shown. Numbers are for further reference of the position of the methoxy groups. For silybin and 2,3-dehydrosilybin, R₃, R₅, R₇, R₂₀, and R₂₃ are OH and R₁₉ is OCH₃. Nor-silybin and nor-dehydrosilybin correspond to the structures with OH at the positions R₃, R₅, R₇, R₁₉, R₂₀, and R₂₃.

effective and the electron-transfer mechanism is predominant. Contrarily, the main mechanism for scavenging free radicals in the case of 2,3-dehydrosilybin and its derivatives is the hydrogen

Received: July 5, 2015

Revised: August 4, 2015

Published: August 10, 2015

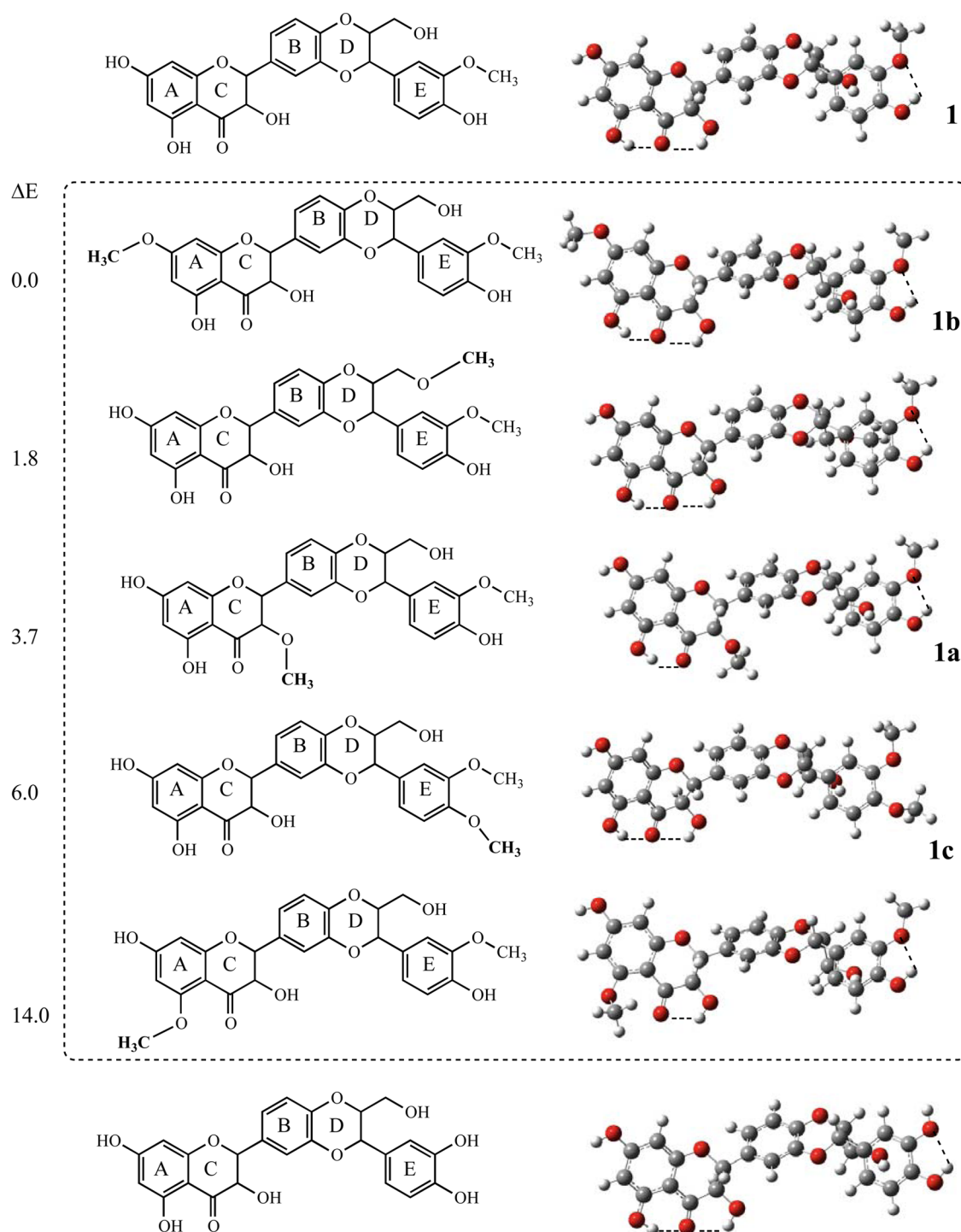


Figure 2. Schematic representation and optimized geometries of silybin and its derivatives are reported. Molecules within the dashed square represent isomers. Labels comply with previous results.¹⁴ ΔE is in kilocalories per mole and corresponds to the energy differences between the isomers compared to the most stable.

atom transfer. Despite all of these results, there are other important considerations that have not been taken into account. The most important is the study of these molecules under physiological conditions (pH 7.4). The importance of pK_a values and the deprotonated molecules was previously reported^{20–22} from the experimental point of view, but there are no theoretical reports, nor do results exist concerning another important mechanism for scavenging a free radical, which is adduct formation.

To fully understand the mechanism of action implemented by free radical scavengers and its relationship with the chemical structure, we report results for six derivatives of silybin (characterized by the absence of the 2,3 double bond) and six derivatives of 2,3-dehydrosilybin (characterized by the presence of the 2,3 double bond). (See Figures 1–3.)

Optimized geometries, Raman spectra, and λ_{\max} values enable characterization and could be very useful for experiments. The analysis of the intramolecular hydrogen bonds gives us the

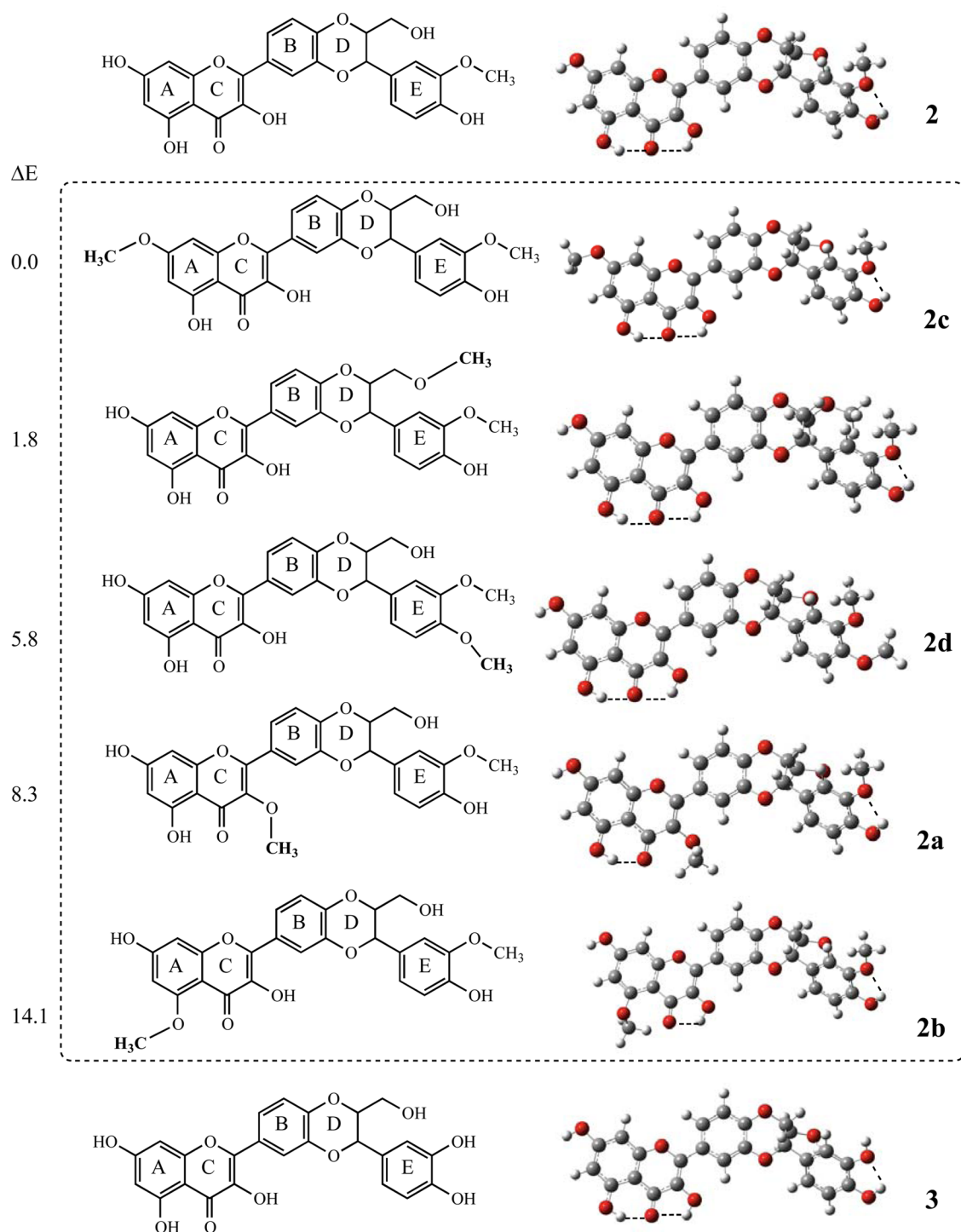


Figure 3. Schematic representation and optimized geometries of 2,3-dehydrosilybin and its derivatives are reported. Molecules within the dashed square are isomers. Labels comply with previous results.¹⁴ ΔE (in kcal/mol) corresponds to the energy differences between the isomers compared with the most stable.

opportunity to highlight their importance in terms of the stability and reactivity of these molecules. We also determine the predominant species under physiological conditions (pH 7.4) and analyze the reactivity of these species. The electron-transfer mechanism is investigated in two directions: as electron donors and also as electron acceptors. Finally, we present results concerning the adduct formation of silybin, 2,3-dehydrosilybin, and some of the derivatives with $\bullet\text{OOH}$.

COMPUTATIONAL DETAILS

Gaussian 09 implementation²³ was used to calculate geometry optimization and electronic properties of six derivatives of silybin and six derivatives of 2,3-dehydrosilybin. Initial geometries were fully optimized at M06/6-31+G(d) level of theory.^{24–28} This methodology was used before to study organic molecules, the good performance of this functional even with relative small basis sets was reported.^{29–31} Harmonic analyses were performed and local minima were identified (zero

imaginary frequencies) to verify optimized minima. Marvin Sketch (version 14.10.27)³² was used to obtain the pK_a at 298 K (pK_a min: 0; pK_a max: 14). The λ_{\max} values had been obtained by applying time-dependent density functional theory (TDDFT) at M06/6-31+G(d) level of theory.

To investigate the single electron-transfer mechanism, vertical ionization energy (I) and vertical electron affinity (A) were obtained from single point calculations of cationic and anionic molecules using the optimized structure of the neutrals and the 6-311+g(d,p) basis set. Water and DMSO were included to mimic polar and nonpolar environments. A useful tool defined previously is the electron full electron donor–acceptor map (FEDAM).^{33,34} In this map (see Figure 4) I and

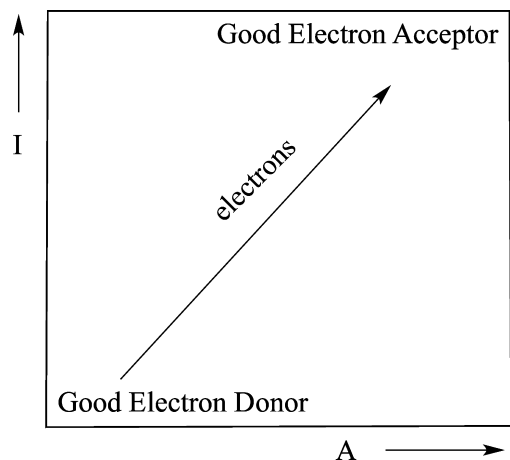


Figure 4. Full electron donor–acceptor map.

A are plotted and allow us to classify substances as either donors or acceptors of electrons. Electrons will be transferred from molecules located down to the left of the map (good electron donors) to those molecules that are up to the right (good electron acceptors).

RESULTS AND DISCUSSION

Geometry Optimization and Hydrogen Bonds. Figure 2 presents a schematic representation and the optimized structures of silybin and its derivatives. Structures of silybin (1), 3-*O-Me*-silybin (1a), 7-*O-Me*-Silybin (1b), and 20-*O-Me*-silybin (1c) are similar to those reported previously.¹⁴ Structures within the dashed square represent the monomethylated derivatives (isomers). Three of these structures present similar stability. The two most stable isomers have three intramolecular hydrogen bonds (dashed lines). The localization of OCH_3 on R_7 or R_{23} produces structures with practically the same stability ($\Delta E = 1.8$ kcal/mol), and it is possible for both to coexist in an experiment. An energy difference smaller than 5 kcal/mol allows us to conclude that two isomers may coexist in an experiment. For the structure located at 3.7 kcal/mol, R_3 is OCH_3 ; therefore, one hydrogen bond is missing. At 6.0 kcal/mol, there is a structure with OCH_3 at R_{20} , and also there are only two hydrogen bonds. Apparently, the hydrogen bond formed between R_{19} and R_{20} is less important for stabilization than the hydrogen bond on R_3 . In the less stable structure (within the dashed square), R_5 is OCH_3 , and there is no hydrogen bond at this position. This destabilizes the structure by 14.0 kcal/mol, indicating that the hydrogen bond at R_5 position is the most important for the stabilization of these

isomers. In Figure 2, it is possible to find another structure, not previously reported. This molecule, named nor-silybin, does not contain OCH_3 and has three intramolecular hydrogen bonds that stabilize the structure. The three structures (presented in Figure 2) that were not published previously and therefore do not have labels, are important for the total characterization of the derivatives of silybin. The methylation on R_5 indicates the importance of the hydrogen bond formed at this position, and nor-silybin (the molecule without OCH_3) enables us to investigate the role of the OH groups in terms of the free radical scavenging capacity of this system.

Figure 3 presents the schematic representation and optimized structures of 2,3-dehydrosilybin and its derivatives. Labels concur with previous reports. Results are similar to those previously reported¹⁴ and also to the results for silybin. In this case, only one structure was not previously reported. It is 1.8 kcal/mol less stable than the ground-state monomethylated derivative and may therefore coexist in an experiment.

The conformational analysis of silybin and 2,3-dehydrosilybin derivatives was previously reported¹⁴ and indicates the importance of H bonding. It is clear that for silybin and 2,3-dehydrosilybin derivatives intramolecular hydrogen bonds are crucial for stabilization. To add information to that previously reported and to analyze the influence of the hydrogen bonds in terms of the stability of these molecules, Figures 5 and 6 present a schematic representation of the optimized structures of silybin and 2,3-dehydrosilybin, with different hydrogen bonds as indicated in the Figures. For both molecules, the most stable structure presents three hydrogen bonds, and the least stable structure has no intramolecular hydrogen bonds. There are two structures of silybin that are less stable by 4.5 kcal/mol than the ground state. Both have two hydrogen bonds, one of them formed with the H atom of OH on R_5 . The difference is the localization of the second hydrogen bond; in one structure it is between the H atom of the OH (on R_3) and the O atom of $C=O$, and in the other it is between the H atom of OH and the O atom of OCH_3 (on R_{23}). In this case, the stabilization due to the presence of this second H bond is the same. For 2,3-dehydrosilybin, there are two structures with two hydrogen bonds, one on R_5 that presents different stability. One of these is similar to silybin, with two H bonds connected to $C=O$. The other structure is less stable by 9.1 kcal/mol. Because of the 2,3-double bond, the structure of 2,3-dehydrosilybin is more rigid than in the case of silybin. This increases the steric impediment of the hydrogen atom on R_3 and the B-ring. For this reason, the structure with the H atom on R_3 turned to ring B is less stable by 9.1 kcal/mol. A stabilizing effect is observed by the hydrogen bond between the H atom of OH and the O atom of the methoxy group, but this stabilization is less than that produced by the stabilization due to the H bonding between the H atom of the hydroxy groups on R_3 and R_5 and the O atom of the $C=O$ group. The hydrogen bond on R_5 is missing in the case of less stable structures. This corroborates the importance of this hydrogen bond for the stabilization of these systems. This is important for further investigations, for example, focusing on silybin as a metal chelating agent.³⁵

The structural characterization of silybin and 2,3-dehydrosilybin derivatives is possible with the Raman spectra and λ_{\max} values. Figure 7 and Table 1 present the Raman spectra and the λ_{\max} values, respectively, for the optimized structures for silybin, 2,3-dehydrosilybin, the most stable structures of the monomethylated derivatives, and those molecules without OCH_3 (nor-silybin and nor-dehydrosilybin). We include only the most

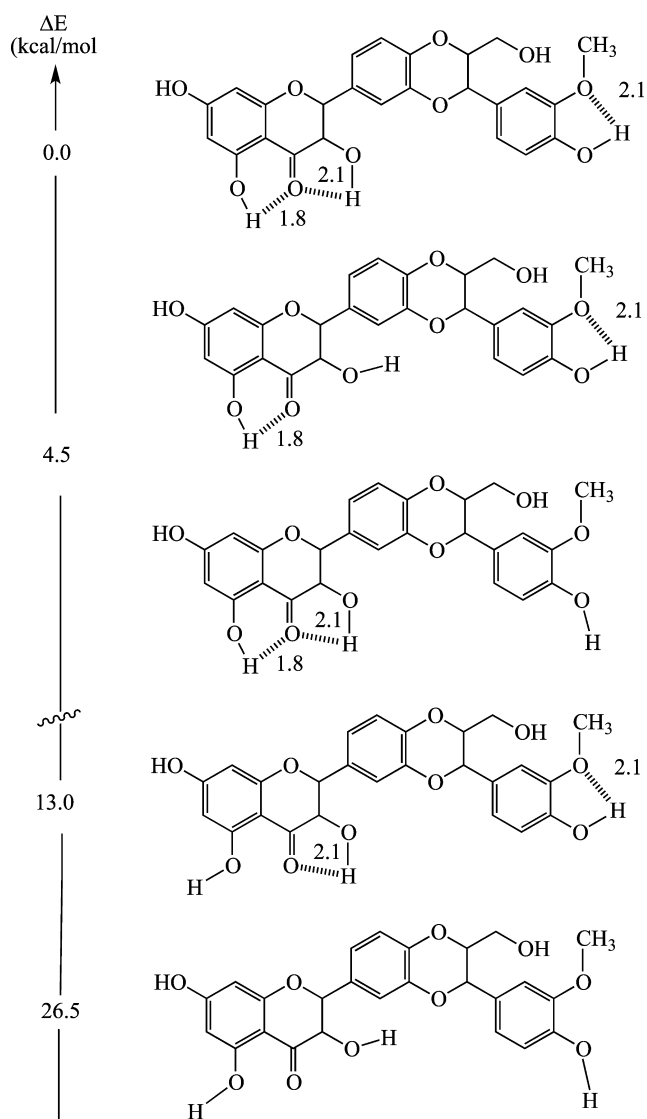


Figure 5. Schematic representation of silybin indicating hydrogen bond lengths (in angstroms).

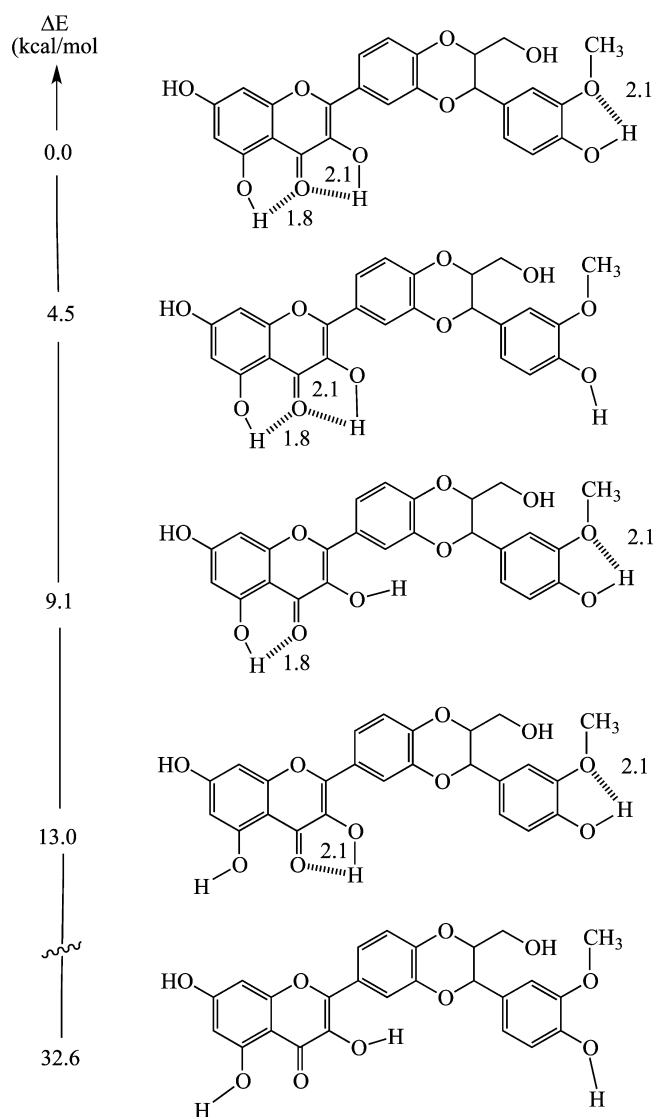


Figure 6. Schematic representation of 2,3-dehydrosilybin. Hydrogen bond lengths are indicated in angstroms.

stable monomethylated derivatives, as the spectra for all of the isomers are similar. Comparing the Raman spectra of silybin and 2,3-dehydrosilybin, there are important differences (indicated by stars). On the basis of this result, the oxidation of silybin into 2,3-dehydrosilybin may be followed with the Raman spectra. For the other spectra, the main difference is the presence of the OCH_3 signals for the monomethylated derivatives, as indicated in Figure 7. Therefore, the most important conclusion, concerning the Raman spectra, is the difference between silybin and 2,3-dehydrosilybin, as this can be useful for monitoring the reaction between them. As apparent in Table 1, λ_{max} corresponds to the UV region and is larger for 2,3-dehydrosilybin derivatives than for silybin. The λ_{max} values make it possible to distinguish between both molecules and may also be useful for following the oxidation between silybin and 2,3-dehydrosilybin. These spectra are very helpful as a reference for further experiments. After this structural characterization, it is possible to analyze the antiradical capacity of these molecules. The most stable structures will be used in what follows for this purpose.

Antiradical Capacity. Electron-Transfer Mechanism. The FEDAMs of the molecules being studied are reported in Figure 8, considering water and DMSO to mimic polar and nonpolar environment. Astaxanthina (Asta), a well-known antiradical molecule, is included for comparison. DPPH was used previously to measure free radical scavenging activity experimentally,¹⁴ and for this reason we include this molecule on the maps. As previously reported,¹⁴ I values are lower for the 2,3-dehydrosilybin derivatives than for silybin derivatives, but for both types of compounds I values are high. Their localization on the map indicates that these molecules were unable to transfer electrons to DPPH. As previously reported,^{33,34} for the purpose of scavenging free radicals, molecules can either donate or accept electrons. Analyzing the capacity to accept electrons, a factor not previously considered, the A values indicate that the molecules being studied represent good electron acceptors and that 2,3-dehydrosilybin derivatives are better electron acceptors than silybin derivatives; however, Asta is a better electron acceptor than silybin and 2,3-dehydrosilybin derivatives, and according to their position on the map, DPPH is the best electron acceptor. Asta is able to

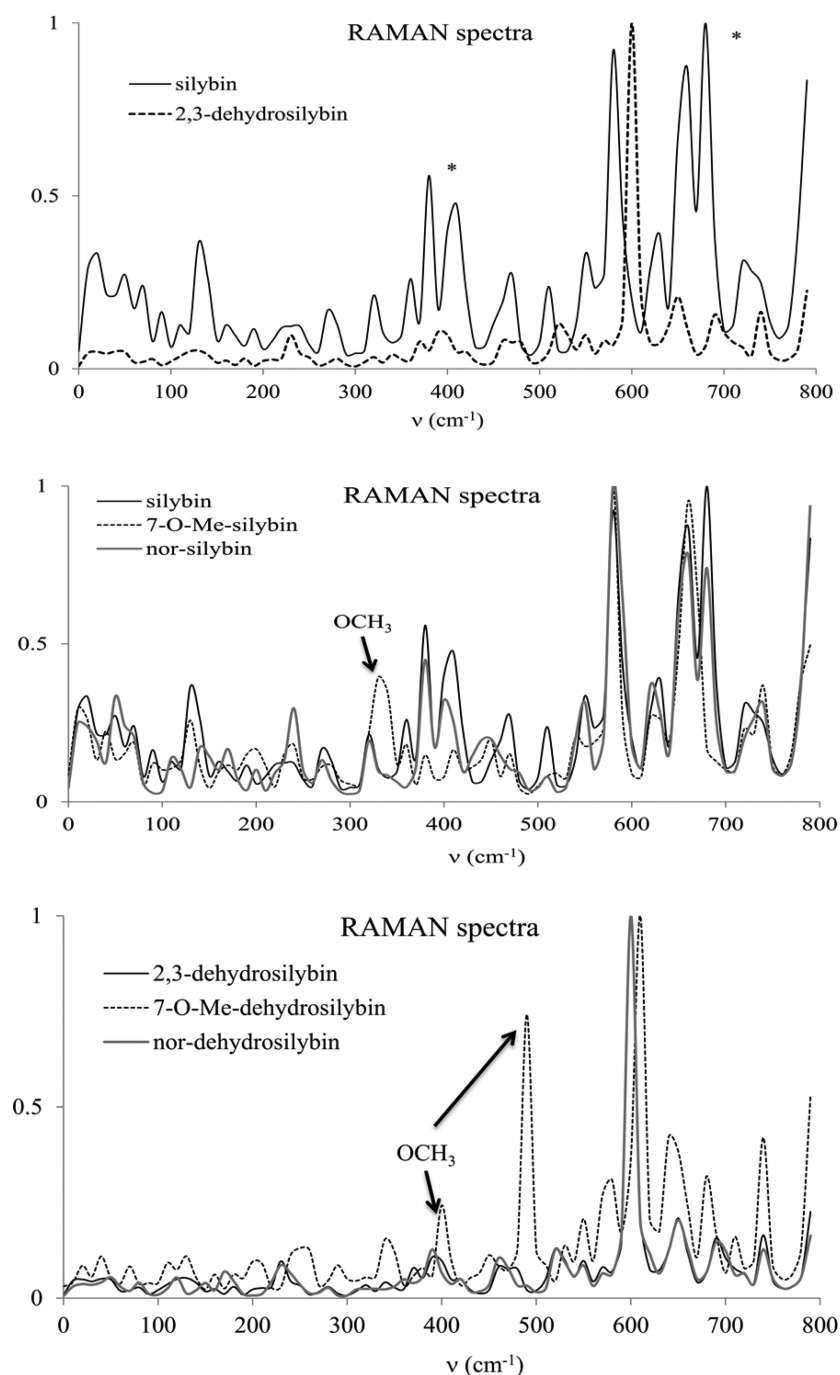


Figure 7. Raman spectra of the ground-state structures: silybin, 2,3-dehydrosilybin, the most stable monomethylated derivatives, nor-silybin, and nor-dehydrosilybin.

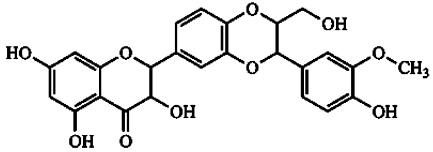
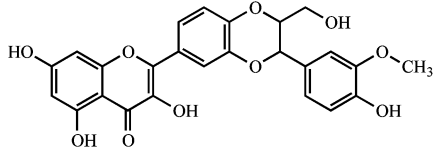
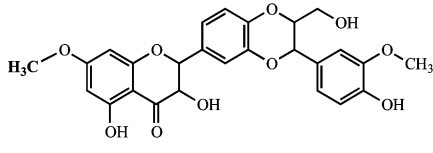
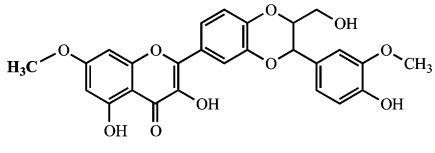
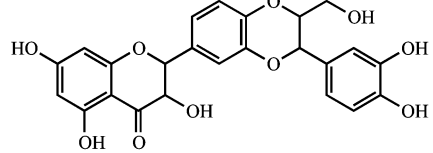
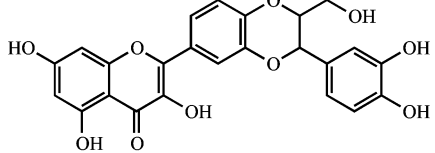
donate electrons to DPPH because it is localized down to the left with respect to DPPH, but silybin and 2,3-dehydrosilybin can neither accept nor donate electrons to DPPH. Concurring with previous results,¹⁴ we can conclude from these values that the electron-transfer mechanism between these molecules and DPPH is not favorable.

It is important to study these molecules under physiological conditions (pH 7.4) to completely analyze antiradical capacity. For this purpose, the pK_a values for each H atom were calculated and also the relative abundance of each species (see Supporting Information, Table 1S). At pH 7.4, ~70% of silybin is protonated but 60% of 2,3-dehydrosilybin is deprotonated. This is an important difference between these two molecules

and means that deprotonated 2,3-dehydrosilybin will be present under physiological conditions and also under the experimental conditions in previous reports.¹⁴ The pK_a values suggest that an important amount of deprotonated species is to be expected in the experiment. Therefore, it is crucial to analyze the electron donor–acceptor properties of the deprotonated molecules.

Figure 8 reports results for the deprotonated species (SIL-H and 2,3-DEHY-H, deprotonated silybin, and 2,3-dehydrosilybin derivatives, respectively). Deprotonated molecules are better electron donors and worse electron acceptors than the nondeprotonated species, and deprotonated 2,3-dehydrosilybin derivatives are better electron donors than the corresponding silybin derivatives. The position on the map indicates that 2,3-

Table 1. Values of λ_{\max} for the Most Stable Structures of Silybin, 2,3-Dehydrosilybin, the Most Stable Structures of the Monomethylated Derivatives (7-O-Me-Silybin and 7-O-Me-Dehydrosilybin), and Molecules without OCH₃ (Nor-Silybin and Nor-Dehydrosilybin)

Silybin and its derivatives	λ_{\max} (nm)	2,3-dehydrosilybin and its derivatives	λ_{\max} (nm)
	269		362
	274		365
	270		362

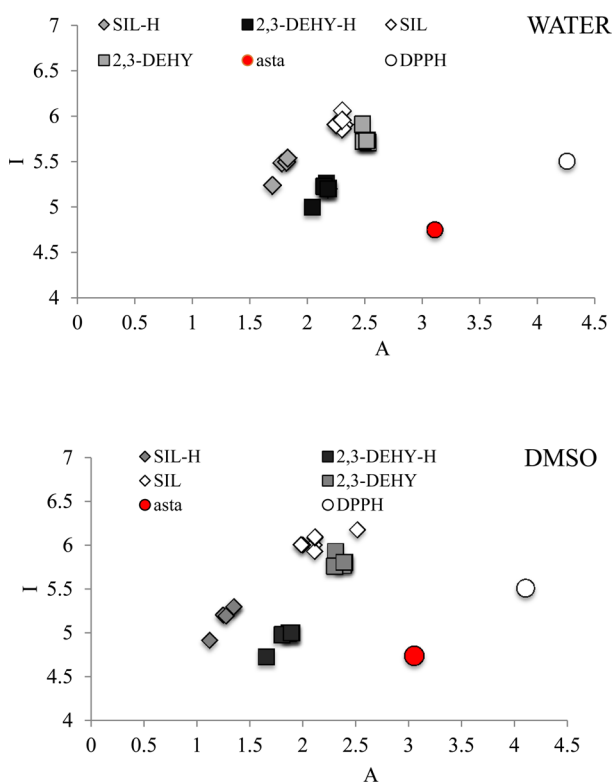
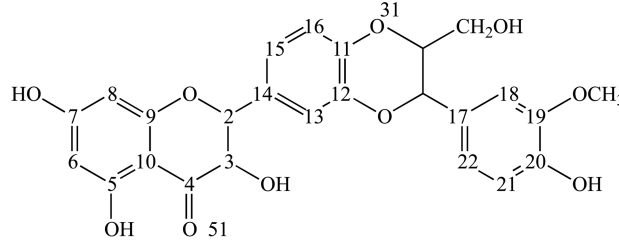


Figure 8. Full electron donor–acceptor map for silybin and its derivatives (SIL), 2,3-dehydrosilybin and its derivatives (2,3-DEHY), their deprotonated species (SIL-H and 2,3-DEHY-H, respectively), and DPPH. Astaxanthina (Asta) is also included for comparison.

DEHY-H molecules are down to the left with respect to DPPH, and they are therefore able to transfer electrons to DPPH. For SIL-H, the position on the map indicates that they are to the left of DPPH (are worse electron acceptors than DPPH), but

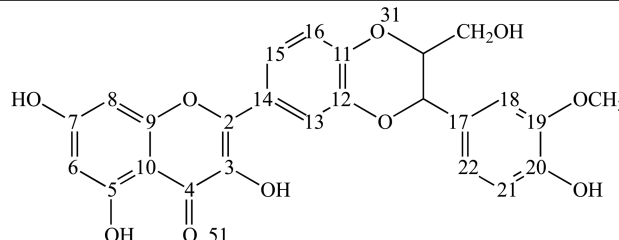
the values for I are similar, and consequently the electron transfer will be less effective. Likewise, under experimental conditions, silybin derivatives are mainly not deprotonated and 2,3-dehydrosilybin are deprotonated. Comparing I values of silybin (5.91 and 6.18 eV, in water and DMSO, respectively), they are higher than the corresponding values for deprotonated 2,3-dehydrosilybin (5.20 and 5.00 eV, in water and DMSO, respectively). The latter is expected to be a better free radical scavenger than the first, in complete agreement with the experimental results previously reported that conclude that the DPPH scavenging activity of 2,3-dehydrosilybin derivatives is higher than that of the silybin derivatives.¹⁴ This is an important result, as the electron-transfer mechanism is expected to be the fastest in terms of scavenging free radicals. The conclusion is thus a little different from that previously reported,¹⁴ as the electron-transfer mechanism is favorable under physiological conditions, given that 2,3-dehydrosilybin derivatives are mainly deprotonated.

Adduct Formation Mechanism. Experimental results¹⁴ indicate that silybin is less effective as a superoxide scavenger than 2,3-dehydrosilybin and nor-dehydrosilybin, with the last of these being the best scavenger. (See table 1 of ref 14.) The electron-transfer mechanism provides a partial explanation for these results, but it is necessary to analyze other possibilities to fully understand these experiments. To this end, the adduct formation mechanism is analyzed using $\bullet\text{OOH}$ as free radical and three molecules as free radical scavengers (those that were reported previously in ref 14): silybin, 2,3-dehydrosilybin, and nor-dehydrosilybin. (For the latter two molecules we used both protonated and deprotonated systems.) The free radical was added at all C–C double bonds or where hydrogen bonds were formed with different oxygen atoms. All systems were fully optimized. Tables 2–6 present the results of the dissociation energies (ΔE) for each free radical adduct molecule. Labels on the schematic representations indicate the position of the addition. Positive values correspond to adduct products that are

Table 2. Dissociation Energies (in kcal/mol) Corresponding to the Following Reaction


Silybin

C4	-15.9	C11	0.5	C17	-1.3
C5	-5.3	C12	8.7	C18	-1.6
C6	-1.7	C13	0.8	C19	7.7
C7	-6.4	C14	9.2	C20	6.8
C8	-3.9	C15	-1.5	C21	-1.9
C9	-2.5	C16	-1.7	C22	-4.2
C10	11.7			O31	8.4
				O51	8.2

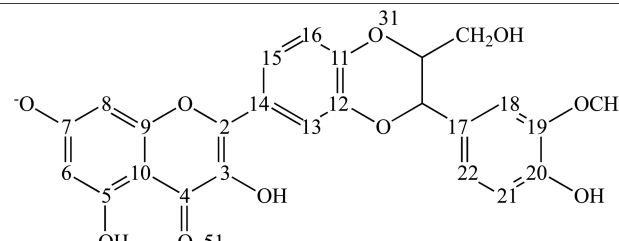
Table 3. Dissociation Energies (in kcal/mol) Corresponding to the Following Reaction: [2,3-Dehydrosilybin-OOH][•] → 2,3-Dehydrosilybin + •OOH^a


2,3-dehydrosilybin

C2	14.1	C11	4.3	C17	-0.6
C3	8.6	C12	-0.05	C18	-1.5
C4	10.7	C13	3.4	C19	2.7
C5	-3.5	C14	-8.7	C20	1.6
C6	-0.1	C15	1.8	C21	-1.9
C7	-4.5	C16	-3.0	C22	-4.4
C8	0.3			O31	8.1
C9	-6.2			O51	12.7
C10	-15.3				

^aThe position where the free radical is bonded is as indicated in the schematic formula.

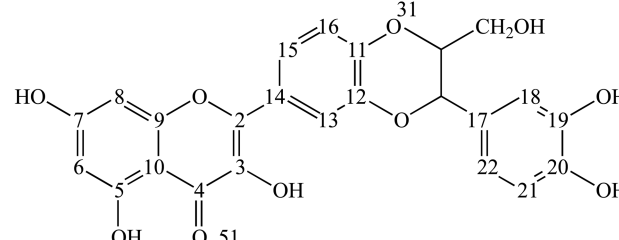
more stable than the corresponding dissociated molecules. The atoms with positive ΔE will be named in this report "reactive atoms". Higher positive values indicate a stronger bond between the free radical scavenger and •OOH. For all of the compounds presented in Tables 2–6, on O31 and O51, the •OOH molecule forms hydrogen bonds that stabilize the products by >8 kcal/mol. Comparing these two reactive atoms, O51 presents more positive values than O31; therefore, this position is more suitable for the reaction. Silybin has nine reactive atoms that form adducts with positive values for ΔE . The most reactive atom is C10 with ΔE of 11.7 kcal/mol. Compared with 2,3-dehydrosilybin, this has 11 reactive atoms that form adducts with positive values for ΔE . In this case, the most stable adduct corresponds to •OOH bonded to C2, with ΔE equal to 14.1 kcal/mol. Moreover, we can also analyze the deprotonated 2,3-dehydrosilybin, considering that its relative abundance under physiological conditions is 60%. Results for deprotonated 2,3-dehydrosilybin are presented in Table 4. For

Table 4. Dissociation Energies (in kcal/mol) Corresponding to the Following Reaction: [2,3-Dehydrosilybin-OOH]^{•-} → [2,3-Dehydrosilybin]⁻ + •OOH^a


2,3-dehydrosilybin de-protonated

C2	19.6	C11	9.3	C17	-0.1
C3	16.0	C12	3.1	C18	-0.7
C4	7.3	C13	8.4	C19	3.3
C5	1.0	C14	-9.7	C20	2.7
C6	14.6	C15	6.1	C21	-1.8
C7	-18.9	C16	-0.3	C22	-5.3
C8	11.0			O31	10.2
C9	2.7			O51	17.3
C10	-2.2				

^aThe position where the free radical is bonded is as indicated in the schematic formula.

Table 5. Dissociation Energies (in kcal/mol) Corresponding to the Following Reaction: [Nor-dehydrosilybin-OOH][•] → Nor-dehydrosilybin + •OOH^a


nor-dehydrosilybin

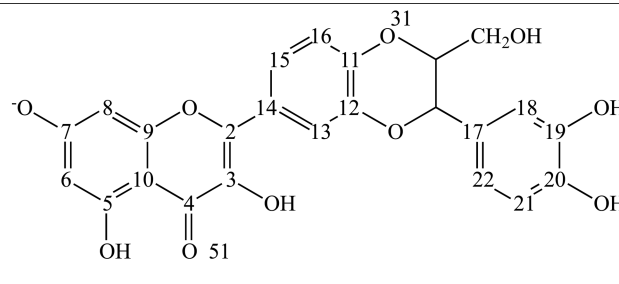
C2	14.1	C11	4.3	C17	-1.2
C3	8.5	C12	-0.1	C18	0.9
C4	10.6	C13	3.4	C19	2.0
C5	-3.5	C14	-8.8	C20	0.8
C6	-0.2	C15	1.8	C21	-1.6
C7	-4.6	C16	-3.1	C22	-4.6
C8	0.3			O31	8.0
C9	-6.2			O51	12.6
C10	-15.4				

^aThe position where the free radical is bonded is as indicated in the schematic formula.

this molecule there are 15 reactive atoms, with positive values for ΔE . The most reactive atoms are C2, C3, C6, and O51, and the highest dissociation energy is 19.6 kcal/mol. This comparison reveals that the reactivity of 2,3-dehydrosilybin (protonated and deprotonated) is higher than for silybin, as the latter have more reactive atoms and the dissociation energies are superior for 2,3-dehydrosilybin (protonated and deprotonated) than for silybin. This is in complete agreement with previous experimental results,¹⁴ which conclude that 2,3-dehydrosilybin is a better free radical scavenger than silybin.

Previous experiments¹⁴ suggest that nor-dehydrosilybin is the best free radical scavenger of all systems being studied. Comparing the results for protonated and deprotonated 2,3-

Table 6. Dissociation Energies (in kcal/mol) Corresponding to the Following Reaction: [Nor-dehydrosilybin-OOH]^{•-} → [Nor-dehydrosilybin]⁻ + •OOH^a



nor-dehydrosilybin de-protonated

C2	19.6	C11	9.4	C17	-0.5
C3	15.9	C12	3.0	C18	1.9
C4	7.2	C13	8.4	C19	3.0
C5	1.0	C14	-9.7	C20	1.9
C6	14.6	C15	6.1	C21	-1.7
C7	-19.0	C16	-0.3	C22	-5.5
C8	11.0			O31	10.1
C9	2.7			O51	17.2
C10	-2.2				

^aThe position where the free radical is bonded is as indicated in the schematic formula.

dehydrosilybin and nor-dehydrosilybin (Tables 3–6), it is clear that ΔE values are very similar. Both nor-dehydrosilybin molecules have one more reactive atom (C18) than 2,3-dehydrosilybin molecules, but ΔE is very small, meaning that •OOH is not strongly bonded to that position. The differences between 2,3-dehydrosilybin and nor-dehydrosilybin are minimal, and it is evident that the substitution of OCH₃ by OH on 2,3-dehydrosilybin does not affect the free radical scavenger capacity when the adduct formation mechanism is analyzed. This does not concur with experimental results that suggest that nor-dehydrosilybin represents the best antiradical. Probably the main mechanism for action in nor-dehydrosilybin is the hydrogen atom transfer mechanism, as previously reported.¹⁴ Despite these results, the conclusions reported here mainly concur with the experiments.

CONCLUSIONS

For silybin and 2,3-dehydrosilybin derivatives, intramolecular hydrogen bonds are crucial for stabilization. The most stable structure presents three hydrogen bonds, and the least stable structure has no intramolecular hydrogen bonds. Hydrogen bond on R₅ is the most important for stabilizing structures.

Raman spectra are very useful for characterizing these systems. Moreover, the oxidation of silybin into 2,3-dehydrosilybin can be followed with the Raman spectra. The main difference on the spectra, between nonmethylated and monomethylated derivatives, is the presence of OCH₃. The λ_{\max} values allow us to distinguish between both molecules and may also be useful for monitoring oxidation between silybin and 2,3-dehydrosilybin. The λ_{\max} values correspond to the UV region and are larger in the case of 2,3-dehydrosilybin derivatives than in the case of silybin.

The electron-transfer mechanism between all molecules being studied and DPPH is not favorable. Under physiological conditions (pH 7.4), ~70% of silybin is protonated, but 60% of 2,3-dehydrosilybin is deprotonated. This is an important difference between these two molecules, implying that

deprotonated 2,3-dehydrosilybin will be present under physiological conditions and also under the experimental conditions of previous reports. Deprotonated molecules represent better electron donors and worse electron acceptors than the nondeprotonated species, and deprotonated 2,3-dehydrosilybin derivatives are better electron donors than the corresponding silybin derivatives. The latter are expected to be worse free radical scavengers than the first.

Concerning the adduct formation mechanism, the reactivity of 2,3-dehydrosilybin (protonated and deprotonated) is higher than that for silybin, as the latter have more reactive atoms. Dissociation energies are also superior for 2,3-dehydrosilybin (protonated and deprotonated) than for silybin.

The conclusions reported in this investigation are in complete agreement with previous experimental results. The free radical scavenging activity of 2,3-dehydrosilybin derivatives is higher than that for silybin derivatives. What was not previously considered was the remarkable importance of the deprotonated species, which may thus be important for future experiments.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b06448.

Optimized structures, pK_a values, relative abundance of each species, and complete references with more than 10 authors. (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: martina@unam.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by DGAPA-PAPIIT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and resources provided by the Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM). This work was carried out using a NES supercomputer, provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank the DGTIC of UNAM for their excellent and free supercomputing services and Caroline Karslake (Masters, Social Anthropology, Cambridge University, England) for reviewing the grammar and style of the text in English. We acknowledge Oralia L. Jiménez, María Teresa Vázquez, and Caín González for their technical support. M.R. thanks CONACyT for the master's scholarship.

REFERENCES

- (1) Schuppan, D.; Jia, J. D.; Brinkhaus, B.; Hahn, E. G. Herbal products for liver diseases: A therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology* **1999**, *30*, 1099–1104.
- (2) Morazzoni, P.; Bombardelli, E. Silybum marianum (Cardus marianus). *Fitoterapia* **1995**, *LXVI*, 3–42.
- (3) Saller, R.; Meier, R.; Brignoli, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **2001**, *61*, 2035–2063.
- (4) Wellington, K.; Jarvis, B. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* **2001**, *15*, 465–489.

- (5) Balian, S.; Ahmad, S.; Zafar, R. Antiinflammatory activity of leaf and leaf callus of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. in albino rats. *Indian J. Pharmacology* **2006**, *38*, 213–214.
- (6) Wagner, H.; Hörhammer, L.; Münster, R. On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum*(L) Gaertn (Carduus marianus L.) . *Arzneimittelforschung* **1968**, *18*, 688–696.
- (7) Mira, L.; Silva, M.; Manso, C. F. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 753–759.
- (8) Gazák, R.; Svobodová, A.; Psotová, J.; Sedmera, P.; Prikrylová, V.; Walterová, D.; Kren, V. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5677–5687.
- (9) Agarwal, R.; Agarwal, C.; Ichikawa, H.; Singh, R. P.; Aggarwal, B. H. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4457–4498.
- (10) Jain, A.; Dwivedi, N.; Bhargava, R.; Flora, S. J. S. Silymarin and naringenin protects nicotine induced oxidative stress in young rats. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2012**, *1*, 41–49.
- (11) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152–159.
- (12) Martínez, A. Donator acceptor map of psittacofulvins and anthocyanins: are they good antioxidant substances? *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4915–4921.
- (13) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584.
- (14) Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gazák, R.; Hrbáč, J.; Sedmera, P.; Kren, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. L.; et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1054–1063.
- (15) Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3232–3237.
- (16) Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects and applications to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173–1183.
- (17) Zhang, H. Y.; Sun, Y. M.; Wang, X.-L. Substituents effects on OH bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in that rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure-reactivity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9*, 502–508.
- (18) Leopoldini, M.; Pitarch, I. P.; Russo, N.; Toscano, M. Structure conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principal theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 92–96.
- (19) Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its raicals in the gas phase and in solvent. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *111*, 210–216.
- (20) György, I.; Antus, S.; Blázovics, A.; Földiák, G. Substituent effects in the free radical reactions of silybin: radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH. *Int. J. Radiat. Biol.* **1992**, *61*, 603–609.
- (21) van Wenum, E.; Jurczakowski, R.; Litwinienko, G. Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of the enol groups. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9102–9112.
- (22) Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, T.; Soffers, A. E. M.; Rietjens, I. M. C. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyl-flavones. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *31*, 869–881.
- (23) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09*, revision A.08; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (24) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, non-covalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- (25) Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193–218.
- (26) Petersson, G. A.; Al-Laham, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6081–6090.
- (27) McLean, A. D.; Chandler, G. S. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z = 11–18. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 5639–5648.
- (28) Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650–654.
- (29) Matisz, G.; Kelterer, A. M.; Fabian, W. M. F.; Kunsági-Máté, S. Coordination of methanol clusters to benzene: a computational study. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 10556–10564.
- (30) Meyer, M. M.; Kass, S. R. Experimental and theoretical gas-phase acidities, bond dissociation energies, and heats of formation of HClO_s, s = 1–4. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 4086–4092.
- (31) Paukku, Y.; Hill, G. Theoretical determination of one-electron redox potentials for DNA bases, base pairs, and stacks. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 4804–4810.
- (32) *Marvin 14.10.27*; ChemAxon: Budapest, Hungary, 2014. <http://www.chemaxon.com>.
- (33) Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M. A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 9037–9042.
- (34) Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on electron transfer reactions between carotenoids and free radicals. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12113–12120.
- (35) Borsari, M.; Gabbi, C.; Ghelfi, F.; Grandi, R.; Saladini, M.; Severi, S.; Borella, F. Silybin, a new iron-chelating agent. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 123–129.