



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO TEÓRICO DE LA REPARACIÓN DEL DAÑO CAUSADO POR
RADICALES LIBRES DE MODELOS PROTEICOS Y LIPÍDICOS Y SUS
MECANISMOS DE ACCIÓN

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. LEONARDO MUÑOZ RUGELES

DR. JUAN RAÚL ÁLVAREZ IDABOY
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2017



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

Al **Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy** por su valiosa tutoría.

Al **CONACyT** por otorgarme la beca **270309**.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas**.

A la **Facultad de Química** de la **UNAM**.

A **Supercómputo** de la **UNAM**.

A la **Dra. Annia Galano Jiménez** de la **UAM** por sus valiosas aportaciones.

Al **Dr. Alberto Vela Amieva** y **Dr. José Pedraza Chaverri** por sus aportaciones.

Al **Dr. Fernando Cortés Guzmán** y **Dr. Rodolfo Gómez Balderas** por su participación en el comité ampliado de Doctorado.

Al **H. Jurado** por sus aportaciones.

Al **Dr. Jorge Martín del Campo Ramírez** por compartir su conocimiento.

A **los integrantes** del grupo de investigación del **Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy**.

A la **Dra. Brenda Nataly Sánchez Eguía** por su apoyo incondicional y su valiosa amistad.

A **mi familia** por su apoyo incondicional.

A mi familia

Comité tutor

Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy

Dr. Alberto Marcial Vela Amieva

Dr. José Pedraza Chaverri

Comité ampliado

Dr. Fernando Cortés Guzmán

Dr. Rodolfo Gómez Balderas

Miembros del jurado

Presidente

Dr. Alberto Marcial Vela Amieva

Secretario

Dr. Jorge Martín del Campo Ramírez

Vocal

Dr. Francisco Miguel de Jesús Castro Martínez

Vocal

Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez

Vocal

Dr. Fernando Cortés Guzmán

Este trabajo se realizó en el Departamento de Física y Química Teórica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy

Divulgación

Congresos

- XIII RMFQ Póster: “Reparación de radicales libres de triptófano y tirosina por ascorbato y urato” celebrado en la ciudad de Morelia, Michoacán, México, Noviembre **2014**.
- XIV RMFQ Póster: “Transferencia secuencial protón-electrón y su relevancia biológica” celebrado en la ciudad de Tonalá, Jalisco, México, Noviembre **2015**.
- 42° QUITEL Charla: “Chemical repair of protein radicals by biologically relevant antioxidants” celebrado en la ciudad de Montevideo, Uruguay, Noviembre **2016**.

Publicaciones

- Muñoz-Rugeles L., Galano A., Alvarez-Idaboy J.R.; **The Role of Acid-Base Equilibria in Formal Hydrogen Transfer Reactions: Tryptophan Radicals Repair by Uric Acid as a Paradigmatic Case**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19 (2017) 15296-15309.
- Muñoz-Rugeles L., Galano A., Alvarez-Idaboy J.R.; **Non-covalent π - π stacking interactions turn off non-adiabatic effects in proton-coupled electron transfer reactions**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19 (2017) 6969-6972.
- Muñoz-Rugeles L., Alvarez-Idaboy J.R.; **A proton-electron sequential transfer mechanism: theoretical evidence about its biological relevance**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 (2015) 28525-28528.

Tabla de contenido

| | Pág. |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| Agradecimientos..... | II |
| Dedicatoria..... | III |
| Comité tutor..... | IV |
| Comité ampliado..... | IV |
| Miembros de jurado..... | V |
| Lugar donde se realizó el trabajo | VI |
| Divulgación..... | VII |
| Abreviaturas y símbolos..... | XIV |
| Lista de tablas..... | XVII |
| Lista de figuras..... | XXII |
| Lista de esquemas..... | XXVIII |
| Resumen..... | XXIX |
| Abstract..... | XXX |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Estrés oxidativo y reparación química..... | 3 |
| 2.1. Especies reactivas. | 4 |
| 2.2. Oxidación de proteínas. | 6 |
| 2.3. Peroxidación lipídica. | 9 |
| 2.4. Reparación química..... | 11 |
| 2.5. Mecanismos de reacción de FHT..... | 15 |
| 3. Marco teórico. | 20 |
| 3.1. Teoría de los funcionales de la densidad: DFT. | 20 |
| 3.1.2. Método de campo auto-consistente de Kohn-Sham..... | 21 |
| 3.1.3. Funcionales de intercambio-correlación: E_{xc} | 22 |
| 3.2. Funciones base..... | 23 |
| 3.2.1. Orbitales tipo gaussiano: GTO. | 23 |
| 3.2.2. Funciones doble y triple zeta..... | 24 |
| 3.2.3. Contracción de funciones bases. | 25 |
| 3.2.4. Funciones de polarización y difusas..... | 26 |
| 3.2.5. Funciones base de Pople. | 27 |
| 3.3. Métodos de solvatación..... | 28 |
| 3.4. Análisis de poblaciones..... | 29 |
| 3.4.1. Análisis de poblaciones de Mulliken..... | 29 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2. Análisis de población natural..... | 31 |
| 3.4.3. Análisis de poblaciones de Hirshfeld. | 33 |
| 3.5. Teoría convencional del estado de transición: TST. | 33 |
| 3.5.1. Degeneración del camino de reacción..... | 35 |
| 3.5.2. Efecto túnel: Potencial asimétrico de Eckart. | 36 |
| 3.6. Estado estándar 1 M. | 38 |
| 3.7. Efectos de la caja de solvente. | 40 |
| 3.8. Reacciones de transferencia electrónica: Teoría de Marcus. | 41 |
| 3.9. Reacciones controladas por la difusión..... | 43 |
| 4. Objetivos..... | 46 |
| 4.1. Objetivo general..... | 46 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 46 |
| 5. Metodología. | 47 |
| 5.1. Método computacional..... | 47 |
| 5.2. Caminos de reacción. | 48 |
| 5.3. Determinación de constantes de velocidad..... | 49 |
| 5.4. Constantes de velocidad a diferentes valores de pH. | 50 |
| 5.5. Constante total de velocidad de reacción..... | 51 |
| 5.6. Análisis mecanístico de reacciones FHT. | 52 |
| 6. Reparación de radicales libres de aminoácidos..... | 54 |
| 6.1. Consideraciones previas..... | 54 |
| 6.1.1. Equilibrio ácido base..... | 54 |
| 6.1.2. Termoquímica en medio acuoso y pentiletanoato..... | 60 |
| 6.1.3. Análisis mecanístico de las reacciones de transferencia formal de átomo de hidrógeno..... | 61 |
| 6.2. Reparación de triptófano por el ácido úrico..... | 63 |
| 6.2.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y ácido úrico..... | 63 |
| 6.2.2. Mecanismos de reparación de triptófano por el ácido úrico. | 65 |
| 6.2.2.1. Reparación de triptófano por la fracción completamente protonada del ácido úrico..... | 65 |
| 6.2.2.2. Reparación de triptófano por la fracción mono-aniónica del ácido úrico..... | 68 |
| 6.2.2.3. Reparación de triptófano por la fracción di-aniónica del ácido úrico..... | 73 |
| 6.2.3. Cinética de la reparación de triptófano por ácido úrico..... | 76 |
| 6.3. Reparación de triptófano por el ácido ascórbico..... | 80 |
| 6.3.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y ácido ascórbico..... | 80 |
| 6.3.2. Mecanismos de reparación de radicales de triptófano por el ácido ascórbico. | 81 |
| 6.3.2.1. Reparación de triptófano por la fracción completamente protonada del ácido ascórbico... | 82 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3.2.2. Reparación de triptófano por la fracción mono-aniónica del ácido ascórbico | 84 |
| 6.3.3. Cinética de la reparación de triptófano por ácido ascórbico..... | 85 |
| 6.4. Reparación de triptófano por el glutatión | 87 |
| 6.4.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y glutatión | 87 |
| 6.4.2. Mecanismos de reparación de radicales de triptófano por el glutatión | 88 |
| 6.4.2.1. Reparación de triptófano por la fracción neutra del glutatión | 88 |
| 6.4.2.2. Reparación de triptófano por la fracción mono-aniónica del glutatión..... | 90 |
| 6.4.2.3. Reparación de triptófano por la fracción di-aniónica del glutatión | 91 |
| 6.4.3. Cinética de la reparación de triptófano por glutatión | 92 |
| 6.5. Reparación de triptófano por el trolox | 93 |
| 6.5.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y trolox | 93 |
| 6.5.2. Mecanismos de reparación de radicales de triptófano por el trolox | 95 |
| 6.5.2.1. Reparación de triptófano por la fracción completamente protonada del trolox..... | 95 |
| 6.5.2.2. Reparación de triptófano por la fracción mono-aniónica del trolox..... | 97 |
| 6.5.3. Cinética de la reparación de triptófano por el trolox | 98 |
| 6.6. Reparación de triptófano por el anión radical superóxido | 100 |
| 6.6.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y el anión radical superóxido ... | 100 |
| 6.6.2. Mecanismos de reparación de radicales de triptófano por el anión radical superóxido | 101 |
| 6.6.2.1. Reparación de triptófano por la fracción completamente protonada del anión radical superóxido..... | 101 |
| 6.6.2.2. Reparación de triptófano por el anión radical superóxido | 104 |
| 6.6.3. Cinética de la reparación de triptófano por el anión radical superóxido | 104 |
| 6.7. Reparación de tirosina por el ácido úrico | 106 |
| 6.7.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y ácido úrico | 106 |
| 6.7.2. Mecanismos de reparación de radicales de tirosina por el ácido úrico..... | 108 |
| 6.7.2.1. Reparación de tirosina por la fracción completamente protonada del ácido úrico..... | 108 |
| 6.7.2.2. Reparación de tirosina por la fracción mono-aniónica del ácido úrico | 109 |
| 6.7.2.3. Reparación de tirosina por la fracción di-aniónica del ácido úrico | 111 |
| 6.7.3. Cinética de la reparación de tirosina por el ácido úrico | 112 |
| 6.8. Reparación de tirosina por el ácido ascórbico | 115 |
| 6.8.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y ácido ascórbico | 115 |
| 6.8.2. Mecanismos de reparación de radicales de tirosina por el ácido ascórbico | 116 |
| 6.8.2.1. Reparación de tirosina por la fracción completamente protonada del ácido ascórbico..... | 117 |
| 6.8.2.2. Reparación de tirosina por la fracción mono-aniónica del ácido ascórbico..... | 118 |
| 6.8.3. Cinética de la reparación de tirosina por ácido ascórbico | 119 |
| 6.9. Reparación de tirosina por el glutatión..... | 120 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.9.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y glutatión..... | 120 |
| 6.9.2. Mecanismos de reparación de radicales de tirosina por el glutatión..... | 121 |
| 6.9.2.1. Reparación de tirosina por la fracción neutra del glutatión..... | 122 |
| 6.9.2.2. Reparación de tirosina por la fracción mono-aniónica del glutatión | 122 |
| 6.9.2.3. Reparación de tirosina por la fracción di-aniónica del glutatión..... | 124 |
| 6.9.3. Cinética de la reparación de tirosina por glutatión | 124 |
| 6.10. Reparación de tirosina por el trolox..... | 125 |
| 6.10.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y trolox | 125 |
| 6.10.2. Mecanismos de reparación de radicales de tirosina por el trolox..... | 126 |
| 6.10.2.1. Reparación de tirosina por la fracción completamente protonada del trolox..... | 126 |
| 6.10.2.2. Reparación de tirosina por la fracción mono-aniónica del trolox. | 128 |
| 6.10.3. Cinética de la reparación de tirosina por trolox | 129 |
| 6.11. Reparación de tirosina por el anión radical superóxido..... | 130 |
| 6.11.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y el anión radical superóxido..... | 130 |
| 6.11.2. Mecanismos de reparación de radicales de tirosina por el anión radical superóxido..... | 131 |
| 6.11.2.1. Reparación de tirosina por la fracción protonada del anión radical superóxido..... | 131 |
| 6.11.2.2. Reparación de tirosina por el anión radical superóxido..... | 133 |
| 6.11.3. Cinética de la reparación de tirosina por el anión radical superóxido | 133 |
| 6.12. Reparación de leucina por el ácido úrico | 134 |
| 6.12.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y ácido úrico..... | 134 |
| 6.12.2. Cinética de la reparación de leucina por el ácido úrico | 137 |
| 6.13. Reparación de leucina por el ácido ascórbico..... | 139 |
| 6.13.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y ácido ascórbico..... | 139 |
| 6.13.2. Cinética de la reparación de leucina por el ácido ascórbico..... | 140 |
| 6.14. Reparación de leucina por el glutatión. | 142 |
| 6.14.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y glutatión | 142 |
| 6.14.2. Cinética de la reparación de leucina por el glutatión | 143 |
| 6.15. Reparación de leucina por el trolox | 144 |
| 6.15.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y trolox | 144 |
| 6.15.2. Cinética de la reparación de leucina por el trolox | 145 |
| 6.16. Mecanismos de reparación de radicales de leucina. | 146 |
| 7. Reparación de radicales libres de ácidos grasos. | 151 |
| 8. Conclusiones..... | 154 |
| 9. Referencias. | 157 |
| Apéndice A1 | 173 |

| | |
|--------------------|-----|
| Apéndice A2 | 175 |
| Apéndice A3 | 176 |
| Apéndice A4 | 177 |
| PUBLICACIONES..... | 178 |

Lista de abreviaturas y símbolos

A

α T = α -tocoferol

AO = antioxidante

AGPI = ácido graso polinsaturado

B

BDFE = *bond dissociation free energies*

D

D = Debye

DFT = *density functional theory*

ΔG_{rx} = energía libre de reacción

ΔG^\ddagger = energía libre de activación

ΔH_{rx} = entalpía de reacción

ΔS_{vib} = entropía vibracional

E

ERO = especie reactiva de oxígeno

ERN = especie reactiva de nitrógeno

ERS = especie reactiva de azufre

EO = estrés oxidativo

EPST = *electron-proton sequential transfer*

F

FHT = *formal hydrogen transfer*

G

GSH_n^o = fracciones de glutatión

H

H_nAsc^o = fracciones de ácido ascórbico

H_nUr^a = fracciones de ácido úrico

H_nTx^a = fracciones de trolox

HAT = *hydrogen atom transfer*

HOMO = *highest occupied molecular orbital*

I

IRC = *intrinsic reaction coordinate*

K

k = constante de velocidad

K_{eq} = constante de equilibrio

L

Leu = leucina

M

MO-LCAO = *Molecular Orbitals as Linear Combination of Atomic Orbitals*

N

NPA = *natural population analysis*

P

pH = potencial hidrógeno

pK_a = logaritmo negativo de la constante de disociación ácida

PCET = *proton coupled-electron transfer*

PEST = *proton-electron sequential transfer*

Q

QM-ORSA = *quantum mechanics based test for overall free radical scavenging activity*

R

RAF = *radical adduct formation*

S

SET = *single electron transfer*

SPGET = *sequential proton gain-electron transfer*

SPLET = *sequential proton loss electron transfer*

SAPL = *solvent assisted proton loss*

SAPG = *solvent assisted proton gain*

SOMO = *single occupied molecular orbital*

T

Trp = triptófano

Trp^{•+} = catión radical de triptófano

Trp_(-H)[•] = radical neutro de triptófano

Tyr = tirosina

Tyr^{•+} = catión radical de tirosina

TyrO[•] = radical neutro de tirosina

TS = *transition state*

TST = *transition state theory*

Lista de tablas

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 2.1. Enzimas generadoras de especies reactivas..... | 6 |
| Tabla 2.2. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el H_nAsc^q para diferentes modelos de estudios..... | 13 |
| Tabla 2.3. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el H_nUr^q para diferentes modelos de estudios..... | 13 |
| Tabla 2.4. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el GSH_n^q para diferentes modelos de estudios..... | 14 |
| Tabla 2.5. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el αT y H_nTx^q para diferentes modelos de estudios..... | 15 |
| Tabla 3.1. Clasificación de Perdew de los funcionales de intercambio-correlación..... | 23 |
| Tabla 6.1. Energías libres de desprotonación para el ácido úrico y ácido ascórbico a pH = 7.4..... | 56 |
| Tabla 6.2. Viabilidad termodinámica para la reparación de Trp por H_nUr^q en medio acuoso..... | 63 |
| Tabla 6.3. Viabilidad termodinámica para la reparación de $Trp_{(-H)}^\bullet$ por H_3Ur en pentiletanoato..... | 64 |
| Tabla 6.4. Datos termodinámicos para la reacción SET del complejo de transferencia de protón [$Trp^{\bullet+} \cdots H_2Ur^-$]..... | 67 |
| Tabla 6.5. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reacción entre los radicales de Trp y H_nUr^q en medio acuoso..... | 77 |
| Tabla 6.6. Datos para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET para la reparación de Trp por H_nUr^q en medio acuoso, calculados a 298.15 K..... | 78 |
| Tabla 6.7. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en el mecanismo PEST en pentiletanoato, calculados a 298.15 K..... | 79 |
| Tabla 6.8. Viabilidad termodinámica para la reparación de Trp por el H_nAsc^q en medio acuoso..... | 80 |
| Tabla 6.9. Viabilidad termodinámica para la reparación de $Trp_{(-H)}^\bullet$ por H_2Asc en pentiletanoato.... | 81 |
| Tabla 6.10. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reacción entre los radicales de Trp y H_nAsc^q | 85 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 6.11. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET, calculados a 298.15 K, para la reparación de Trp por H _n Asc ^q | 86 |
| Tabla 6.12. Viabilidad termodinámica para la reparación de Trp por el GSH _n ^q | 87 |
| Tabla 6.13. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación de los radicales de Trp por el GSH _n ^q | 92 |
| Tabla 6.14. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET, calculados a 298.15 K, para la reparación de Trp por GSH _n ^q | 92 |
| Tabla 6.15. Viabilidad termodinámica para la reparación de Trp por el H _n Tx ^q | 94 |
| Tabla 6.16. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación de los radicales de Trp por el H _n Tx ^q | 98 |
| Tabla 6.17. Viabilidad termodinámica para la reparación de Trp por los radicales HO ₂ [•] y O ₂ ^{•-} | 100 |
| Tabla 6.18. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación de los radicales de Trp por el H _n O ₂ ^q | 105 |
| Tabla 6.19. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET, calculados a 298.15 K, para la reparación de Trp por H _n O ₂ ^q | 105 |
| Tabla 6.20. Viabilidad termodinámica para la reparación del radical TyrO [•] por el H _n Ur ^q | 106 |
| Tabla 6.21. Viabilidad termodinámica para la reparación de TyrO [•] por H ₃ Ur en pentiletanoato..... | 108 |
| Tabla 6.22. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación del radical TyrO [•] por el H _n Ur ^q | 113 |
| Tabla 6.23. Viabilidad termodinámica para la reparación del radical TyrO [•] por H _n Asc ^q | 115 |
| Tabla 6.24. Viabilidad termodinámica para la reparación de TyrO [•] por H ₂ Asc en pentiletanoato.... | 116 |
| Tabla 6.25. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación del radical de TyrO [•] por el H _n Asc ^q en medio acuoso..... | 120 |
| Tabla 6.26. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación del radical TyrO [•] por el H _n Asc ^q en pentiletanoato..... | 120 |
| Tabla 6.27. Viabilidad termodinámica para la reparación del radical TyrO [•] por el GSH _n ^q | 121 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 6.28. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación del radical TyrO• por el GSH _n ^q | 124 |
| Tabla 6.29. Viabilidad termodinámica para la reparación del radical TyrO• por el H _n Tx ^q | 126 |
| Tabla 6.30. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación del radical TyrO• por el H _n Tx ^q | 129 |
| Tabla 6.31. Viabilidad termodinámica para la reparación del radical TyrO• por los radicales O ₂ ^{•-} y HO ₂ [•] | 130 |
| Tabla 6.32. Datos cinéticos a 298.15 K para los mecanismos de reparación del radical TyrO• por el H _n O ₂ ^q | 133 |
| Tabla 6.33. Viabilidad termodinámica para la reparación de Leu por H _n Ur ^q | 135 |
| Tabla 6.34. Viabilidad termodinámica para la reparación de radicales de Leu por H ₃ Ur en pentiletanoato | 137 |
| Tabla 6.35. Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el H _n Ur ^q en medio acuoso..... | 138 |
| Tabla 6.36. Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el H ₃ Ur en petiletanoato..... | 138 |
| Tabla 6.37. Viabilidad termodinámica para la reparación de Leu por H _n Asc ^q | 139 |
| Tabla 6.38. Viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación de radicales de Leu por H ₂ Asc en pentiletanoato..... | 140 |
| Tabla 6.39. Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el H _n Asc ^q en medio acuoso..... | 141 |
| Tabla 6.40. Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el H ₂ Asc en petiletanoato..... | 141 |
| Tabla 6.41. Viabilidad termodinámica para la reparación de Leu por GSH _n ^q | 142 |
| Tabla 6.42 Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el GSH _n ^q | 143 |
| Tabla 6.43. Viabilidad termodinámica para la reparación de Leu por H _n Tx ^q | 144 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 6.44. Viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación de radicales de Leu por H ₂ Tx en pentiletanoato..... | 145 |
| Tabla 6.45. Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el H _n Tx ⁹ | 146 |
| Tabla 6.46. Datos cinéticos a 298.15 K para la reparación de radicales de Leu por el H ₂ Tx en pentiletanoato..... | 146 |
| Tabla 7.1. Viabilidad termodinámica para la reparación del daño oxidativo del ácido deca-5,8-dienoico por diferentes compuestos antioxidantes..... | 152 |
| Tabla A3-1. Viabilidad termodinámica para la transferencia electrónicas desde las diferentes fracciones de los reparadores hacia los radicales de Leu | 177 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 2.1. Velocidades relativas de oxidación (k_{rel}) de α -aminoácidos acetilados..... | 9 |
| Figura 2.2. Variación de cargas NPA y densidad de espín de Hirshfeld para los modelos de HAT y PCET..... | 19 |
| Figura 3.1. Comportamiento de las funciones STO y GTO..... | 24 |
| Figura 3.2. Polarización de una función p (χ_2) por la adición de una función d (χ_1)..... | 26 |
| Figura 3.3. Representación esquemática de un medio de solvatación implícito..... | 28 |
| Figura 3.4. Ilustración esquemática de un camino de reacción..... | 34 |
| Figura 3.5. Función asimétrica de Eckart..... | 36 |
| Figura 3.6. Representación esquemática de las superficies de Marcus para una reacción de transferencia electrónica..... | 42 |
| Figura 3.7. Representación esquemática del reordenamiento de los momentos dipolares de las moléculas de solvente durante el proceso de transferencia electrónica..... | 43 |
| Figura 6.1. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y H_3Ur | 66 |
| Figura 6.2. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ por H_3Ur a través del mecanismo de reacción PEST..... | 68 |
| Figura 6.3. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y H_2Ur^- | 70 |
| Figura 6.4. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y H_2Ur^- | 71 |
| Figura 6.5. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por H_2Ur^- a través del mecanismo de reacción SPGET..... | 72 |
| Figura 6.6. Coordenada intrínseca de reacción para la reacción $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{HUr}^{2-}$ | 74 |
| Figura 6.7. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y HUr^{2-} | 74 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 6.8. Características de la coordenada intrínseca de reacción para la reacción entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HUr^{2-} | 75 |
| Figura 6.9. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y H_2Ur^- | 76 |
| Figura 6.10. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PEST y SPGET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ | 79 |
| Figura 6.11. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y H_2Asc | 83 |
| Figura 6.12. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por H_2Asc a través del mecanismo de reacción PEST..... | 83 |
| Figura 6.13. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HAsc^- | 84 |
| Figura 6.14. Dependencia en el pH para las constantes de velocidad y porcentaje de contribución para los mecanismos PEST, SPGET y PCET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$ | 86 |
| Figura 6.15. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y GSH_2 | 89 |
| Figura 6.16. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y GSH^- | 90 |
| Figura 6.17. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por GS^{2-} a través del mecanismo de reacción SPGET..... | 91 |
| Figura 6.18. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PEST y SPGET, para la reparación de radicales de Trp por el GSH_n^{q} | 93 |
| Figura 6.19. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y H_2Tx | 96 |
| Figura 6.20. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HTx^- | 97 |
| Figura 6.21. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PCET y SET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$ | 99 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 6.22. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HOO^{\bullet} | 102 |
| Figura 6.23. Variación de densidad electrónica después de la transferencia electrónica vertical para el complejo $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{O}_2^{\bullet-}]$ | 103 |
| Figura 6.24. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por HOO^{\bullet} a través del mecanismo de reacción PEST..... | 103 |
| Figura 6.25. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PCET y SET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{O}_2^{\text{q}}$ | 105 |
| Figura 6.26. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y H_3Ur | 109 |
| Figura 6.27. Perfil de reacción para la reparación del radical TyrO^{\bullet} por H_2Ur^- a través del mecanismo PCET..... | 110 |
| Figura 6.28. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y H_2Ur^- | 111 |
| Figura 6.29. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y HUr^{2-} | 112 |
| Figura 6.30. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO^{\bullet} por cada fracción del $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ | 114 |
| Figura 6.31. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y H_2Asc | 117 |
| Figura 6.32. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y HAsc^- | 118 |
| Figura 6.33. Dependencia en el pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PEST, SPGET y PCET, para la reparación del radical de TyrO^{\bullet} por el $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$ | 120 |
| Figura 6.34. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y GSH_2 | 123 |
| Figura 6.35. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO^{\bullet} y GSH^- | 123 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 6.36. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO• por cada fracción del GSH _n ^q | 125 |
| Figura 6.37. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO• y H ₂ Tx..... | 127 |
| Figura 6.38. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical TyrO• y HTx ⁻ | 128 |
| Figura 6.39. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO• por cada fracción del H _n Tx ^q | 129 |
| Figura 6.40. Cargas atómicas NPA y densidad de espín Hirshfeld para la reparación del radical TyrO• por el HOO•..... | 132 |
| Figura 6.41. Orbital molecular doblemente ocupado de mayor energía a la geometría del estado de transición para la reacción entre los radicales TyrO• y HOO•..... | 132 |
| Figura 6.42. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO• por cada fracción del H _n O ₂ ^q | 133 |
| Figura 6.43. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reparación entre el radical Leu _γ • y H ₂ Ur ⁻ | 148 |
| Figura 6.44. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical Leu _γ • y HAsc ⁻ | 148 |
| Figura 6.45. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical Leu _γ • y GSH ⁻ | 149 |
| Figura 6.46. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical Leu _γ • y HTx ⁻ | 149 |
| Figura A1-1. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical Trp _(-H) • y H ₃ Ur..... | 173 |
| Figura A1-2. Perfil de reacción para la reparación del radical Trp _(-H) • por H ₃ Ur a través del mecanismo de reacción PEST..... | 173 |
| Figura A1-3. Cargas atómicas NPA, densidad de espín Hirshfeld y orbitales HOMO y SOMO para la reacción de reparación entre el radical Trp _(-H) • y H ₃ Ur..... | 174 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura A1-4. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ por H_3Ur a través del mecanismo de reacción PEST..... | 174 |
| Figura A2-1. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por HAsc^- a través del mecanismo de reacción SPGET..... | 175 |
| Figura A3-1. Perfil de reacción para la reparación del catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ a través del mecanismo de reacción SPGET..... | 176 |

Lista de esquemas

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Esquema 2.1. Daño sobre residuos de triptófano mediado por especies reactivas..... | 7 |
| Esquema 2.2. Daño sobre residuos de tirosina mediado por especies reactivas..... | 8 |
| Esquema 2.3. Estructura del fosfolípido fosfatidilserina, donde X puede ser H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ y Ca ⁺ | 10 |
| Esquema 2.4. Etapa de iniciación de la peroxidación lipídica. Transferencia formal de hidrógeno desde el carbono bis-alílico y segunda etapa, adición de oxígeno..... | 10 |
| Esquema 2.5. Mecanismos de reacción concertados para las reacciones FHT..... | 15 |
| Esquema 2.6. Posibles mecanismos de reacción de transferencia formal de hidrógeno..... | 18 |
| Esquema 6.1. Oxidación del triptófano y equilibrio ácido-base..... | 55 |
| Esquema 6.2. Radicales de tirosina en equilibrio ácido-base..... | 55 |
| Esquema 6.3. Radicales de Leucina centrados en átomos de carbono..... | 55 |
| Esquema 6.4. Especies en equilibrio ácido-base para el ácido úrico..... | 56 |
| Esquema 6.5. Especies en equilibrio ácido-base para el ácido <i>L</i> -ascórbico..... | 56 |
| Esquema 6.6. Especies en equilibrio ácido-base para el glutatión..... | 57 |
| Esquema 6.7. Especies en equilibrio ácido-base para el trolox..... | 57 |
| Esquema 6.8. Reacciones de reparación de radicales de triptófano por el ácido úrico..... | 60 |
| Esquema 7.1. Modelo de daño de ácido graso y reparadores estudiados..... | 153 |

Resumen

Los seres vivos se encuentran sometidos constantemente a la acción oxidante de diversas especies reactivas, proceso denominado estrés oxidativo. Las proteínas y ácidos grasos son blancos importantes de dichas especies, y su oxidación se encuentra asociada al desarrollo de diferentes patologías. Por otro lado, los seres vivos cuentan con una variedad de sistemas químicos capaces de prevenir y reparar el daño ocasionado por el estrés oxidativo. Sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos de reacción a través de los cuales ocurren los procesos de reparación mediados por compuestos como el ácido úrico, ácido ascórbico, glutatión y α -tocoferol, reconocidos antioxidantes de relevancia biológica.

En este trabajo se describe de forma detallada los mecanismos de reacción asociados a la reparación de radicales libres de triptófano, tirosina y leucina por el ácido úrico, ácido ascórbico, glutatión, trolox y anión radical superóxido. Se identificaron, con base en la teoría de los funcionales de la densidad, los mecanismos de reacción que permiten explicar diferentes datos cinéticos experimentales disponibles en la literatura. Los mecanismos de reacción secuenciales de transferencia de protón-electrón (*Proton-Electron Sequential Transfer*, PEST), transferencia de electrón-protón (*Electron-Proton Sequential Transfer*, EPST) y ganancia de protón-transferencia electrónica (*Sequential Proton Gain-Electron Transfer*, SPGET) son descritos por primera vez.

Adicionalmente, se estudió la reparación hipotética de un modelo de daño de ácido graso con 13 antioxidantes lipofílicos. Los resultados indican que los antioxidantes estudiados son incapaces de reparar el daño ocasionado por radicales libres a los residuos de ácidos grasos en las membranas celulares.

Los resultados presentados en este trabajo, son de relevancia para el diseño racional de compuestos antioxidantes sintéticos.

Abstract

Living organisms are constantly subjected to the oxidizing action of various reactive species, a process called oxidative stress. Proteins and fatty acids are important targets of the reactive species, and their oxidation is associated with the development of different pathologies. On the other hand, living organisms have a variety of chemical systems able to prevent and repair the damage caused by oxidative stress. However, little is known about the reaction mechanisms through which repair processes are mediated by compounds such as uric acid, ascorbic acid, glutathione and α -tocopherol, which are recognized as biologically important antioxidants.

This work describes in detail the reaction mechanisms associated to the repair processes of oxidized tryptophan, tyrosine and leucine by uric acid, ascorbic acid, glutathione, trolox and superoxide radical anion. Based on the density functional theory, we identified the reaction mechanisms that allow to explain different experimental kinetic data available in the literature. The sequential reaction mechanism Proton-Electron Sequential Transfer (PEST), Electron-Proton Sequential Transfer (EPST) and Sequential Proton Gain-Electron Transfer (SPGET) are described for the first time.

Additionally, we studied the hypothetical repair of a damaged fatty acid model with 13 lipophilic antioxidants, but the results indicate that the antioxidants studied are unable to repair the damage caused by free radicals to fatty acid in cell membranes.

The results presented in this work are relevant for the rational design of synthetic antioxidant compounds.

1. Introducción.

La química computacional es una disciplina emergente de la química teórica, en la cual se hace uso de métodos matemáticos para explicar diferentes problemas químicos.^[1,2] Actualmente, la química computacional ha encontrado aplicación en diferentes áreas de investigación, como son el diseño de materiales,^[3] diseño de fármacos,^[4] estudio de propiedades fotoquímicas y fotofísicas,^[5] fenómenos de transporte en membranas celulares,^[6] estudios de mecanismos de reacción,^[7] diseño de catalizadores,^[8] diseño en síntesis orgánica,^[9] química atmosférica,^[10] cinética química,^[11] etc. Entre los diferentes métodos computacionales disponibles para el desarrollo de simulaciones moleculares, se destaca la teoría de los funcionales de la densidad (*density functional theory*, DFT), ya que permite estudiar sistemas químicos de forma eficiente y con un grado de exactitud adecuado.^[2,12-14]

Una de las áreas en las que la DFT ha probado ser una herramienta de gran utilidad, es en el estudio de la actividad antioxidante de compuestos orgánicos, tema de gran relevancia biológica. Un ejemplo sobresaliente de dicha aplicación, es el protocolo QM-ORSA (*quantum mechanics based test for overall free radical scavenging activity*), que ha demostrado tener la capacidad de reproducir un número considerable de constantes de velocidad de reacción experimentales, con un grado de exactitud excepcional (el error absoluto medio asociado a 16 reacciones radical-molécula, utilizadas para validar la metodología, es inferior a 1 kcal/mol).^[15]

La metodología QM-ORSA ha demostrado ser útil, no sólo para el estudio de reacciones radical-molécula asociadas a la prevención del daño ocasionado por radicales libres (estrés oxidativo), sino también para el estudio de reacciones de reparación de biomoléculas por antioxidantes con relevancia biológica.^[16,17] J. R. Alvarez-Idaboy y A. Galano, aplicaron la metodología QM-ORSA para el estudio de la reparación del estrés oxidativo del ácido desoxirribonucleico (ADN) por el glutatión, el cual es un antioxidante presente en altas concentraciones en el citoplasma de las células en seres humanos.^[16] Los resultados presentados en ese trabajo, indican que el glutatión puede reparar radicales centrados en los átomos de carbono de los residuos de ribosa a velocidades controladas por la difusión, y que dicho proceso de reparación ocurre lo suficientemente rápido como para prevenir el daño permanente en el ADN.

En una publicación reciente, R. Castañeda-Arriaga *et al.*, modelaron la reparación química de aminoácidos alifáticos mediada por el ácido dihidrolipoico, aplicando la metodología QM-ORSA.^[17] Los cálculos indicaron que, de forma similar a la reparación de radicales de ADN por el glutatión, el

ácido dihidrolipoico tiene la capacidad de reparar radicales centrados en átomos de carbono a velocidades controladas por la difusión.

Existe evidencia experimental acerca de la capacidad del ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión y α -tocoferol, de reparar residuos de triptófano y tirosina oxidados por radicales libres.^[18-27] Sin embargo, es poco o nada la información acerca de los mecanismos de reacción a través de los cuales ocurre la reparación química en estos sistemas. Por tal razón, en este trabajo se ha aplicado la metodología QM-ORSA al estudio de las reacciones de reparación de residuos de triptófano, tirosina y leucina por el ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión y trolox (un análogo del α -tocoferol soluble en medio acuoso). Los resultados obtenidos explican las observaciones experimentales para la reparación de triptófano y tirosina con un excelente grado de exactitud (errores en las barreras de activación inferiores a 2 kcal/mol) además de identificar los diferentes mecanismos de reacción asociados a los procesos de reparación química estudiados.

Adicionalmente, se han estudiado las reacciones de reparación de ácidos grasos por diferentes antioxidantes lipofílicos. Sin embargo, los resultados obtenidos, para los antioxidantes estudiados, revelan que el daño ocasionado por radicales libres a los ácidos grasos, es irreparable.

2. Estrés oxidativo y reparación química.

Los organismos vivos se encuentran expuestos a la acción oxidante de especies químicas reactivas, dentro de las cuales destacan los radicales libres.^[28-30] Los radicales libres son entidades moleculares o atómicas que poseen uno o más orbitales semillenos, característica que, por lo general, les confiere una alta reactividad. Los radicales libres pueden contener átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre en sus estructuras, y se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO),^[31] nitrógeno (ERN)^[32] y azufre (ERS),^[33] respectivamente. Adicional a los radicales libres, existen especies reactivas de capa cerrada, en las cuales todos los orbitales se encuentran doblemente ocupados.^[34]

Las ERO; ERN y ERS, así como la radiación ionizante, pueden inducir la oxidación del ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), fosfolípidos y proteínas, fenómenos de daño biomolecular conocido como estrés oxidativo (EO).^[29] En la actualidad, el EO se encuentra asociado al desarrollo de diferentes patologías, y, por lo tanto, es el tema central de un gran número de investigaciones en el área de química.^[30]

Los organismos vivos cuentan con una colección de especies químicas antioxidantes (AO) capaces de evitar, retardar y/o reparar los efectos del EO. Los antioxidantes pueden ser enzimáticos,^[35] como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), o no-enzimáticos,^[36] como el ácido ascórbico (H_nAsc^a), ácido úrico (H_nUr^a), glutatión (GSH_n^a) y α -tocoferol (αT). La reparación del EO mediada por sistemas no-enzimáticos, se denomina reparación química. En la actualidad, bajas concentraciones de AO no-enzimáticos se encuentran relacionadas al desarrollo de diferentes patologías que se caracterizan por altos niveles de EO, lo que demuestra el papel esencial de los sistemas AO en la prevención y reparación del EO, i.e., bajas concentraciones de AO no-enzimáticos son incapaces de prevenir y revertir los efectos nocivos del estrés oxidativo.^[37-45]

Por otro lado, los mecanismos de reacción a través de los cuales se ejerce la actividad antioxidante, no son conocidos en su totalidad. Datos cinéticos experimentales para reacciones de prevención y reparación del EO, son de gran valor para el desarrollo de estudios teóricos, ya que permiten validar o descartar una determinada propuesta mecanística por comparación.

En este capítulo, se discute el origen de algunas especies reactivas presentes en el organismo y el efecto oxidativo que tienen sobre proteínas y lípidos; se presenta una recopilación de constantes de velocidad de reparación química de radicales en proteínas. Finalmente, se discute la complejidad asociada a los posibles mecanismos de reacción en procesos de prevención y reparación química del EO.

2.1. Especies reactivas.

El organismo produce una gran variedad de especies reactivas durante el metabolismo.^[28-30,34] Algunos ejemplos son el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), los radicales alcoxilo (RO^{\bullet}), los radicales peroxilo (ROO^{\bullet}), el anión radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}). Algunos ejemplos de especies reactivas de capa cerrada son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$), el ácido hipobromoso ($HOBr$), el ozono (O_3), el oxígeno singlete (1O_2), y el peroxinitrito ($ONOO^-$).

El $O_2^{\bullet-}$ puede formarse por la reacción entre Fe^{2+} y 3O_2 ,^[46,47] como se muestra en la reacción (2.1).



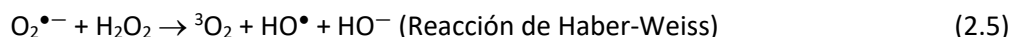
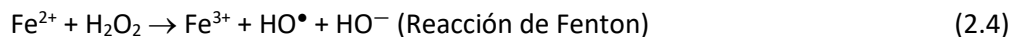
La principal fuente de $O_2^{\bullet-}$ en células es la mitocondria y se genera durante la cadena de transferencia de electrones, la cual ocurre en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y complejo III (ubiquinona-citocromo C reductasa) de la membrana mitocondrial.^[48] En la cadena de transferencia de electrones, se produce un intermediario inestable (la semiquinona anión radical) que transfiere un electrón al 3O_2 y da origen a la formación del anión radical $O_2^{\bullet-}$.^[34] Es importante considerar que el $O_2^{\bullet-}$ se encuentra en equilibrio ácido-base con el radical HOO^{\bullet} (reacción (2.2)), especie que tiene un valor de $pK_a = 4.8$, i.e., ~0.3% del anión radical $O_2^{\bullet-}$ se encuentra protonado en el citoplasma de una célula eucariota.^[49]



Una vez que se forma el $O_2^{\bullet-}$, la superóxido dismutasa (SOD), en presencia de 3O_2 y H_2O , cataliza la formación de H_2O_2 , reacción (2.3).^[50]



A su vez, el H_2O_2 puede dar origen a la formación del radical HO^{\bullet} a través de las reacciones de Fenton^[51] y Haber-Weiss^[52] (reacción (2.4) y (2.5), respectivamente), ERO que se caracteriza por ser altamente oxidante.



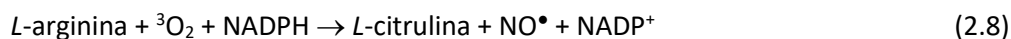
El HOCl es una especie reactiva de capa cerrada, la cual es producida por neutrófilos activados en tejidos inflamados. Se forma por la reacción entre H_2O_2 y Cl^- catalizada por la enzima mieloperoxidasa, reacción (2.6).^[53]



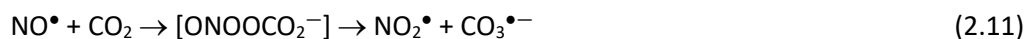
El HOCl es capaz de oxidar al H_nAsc^q , H_nUr^q , nucleótidos, triptófano y tioles.^[54,55] Adicionalmente, puede clorar aminos, residuos de tirosina, lípidos insaturados, colesterol y ADN.^[56-59] Una característica importante del HOCl, es la capacidad de formar $^1\text{O}_2$ al reaccionar con H_2O_2 , reacción (2.7).^[60] El $^1\text{O}_2$ es una especie altamente reactiva, capaz de dañar tejidos y oxidar al ADN.^[61-63]



El NO^\bullet se produce durante la transformación de la *L*-arginina a *L*-citrulina, reacción catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas, reacción (2.8).^[64]



El NO^\bullet presenta una baja reactividad hacia moléculas de capa cerrada, sin embargo, su reacción con algunas moléculas de capa abierta da origen a la formación de especies altamente reactivas capaces de mediar el daño biomolecular. La reacción de NO^\bullet con $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $^3\text{O}_2$ produce ONOO^- y NO_2^\bullet , respectivamente, reacciones (2.9) y (2.10).^[65] La reacción con CO_2 produce los radicales NO_2^\bullet y $\text{CO}_3^{\bullet-}$, reacción (2.11).^[66]



La producción de las especies reactivas, presentadas en las reacciones (2.1)-(2.11), ocurre en diferentes compartimentos celulares, tales como la mitocondria, peroxisomas y retículo endoplasmático.^[29,34] Actualmente, existen un gran número de enzimas que han sido identificadas como fuentes de especies reactivas, algunas de ellas se listan en la tabla 2.1. Adicional a las fuentes endógenas ya mencionadas, también existen fuentes exógenas como son los contaminantes del aire y agua, radiación ionizante, altas temperaturas, etc.

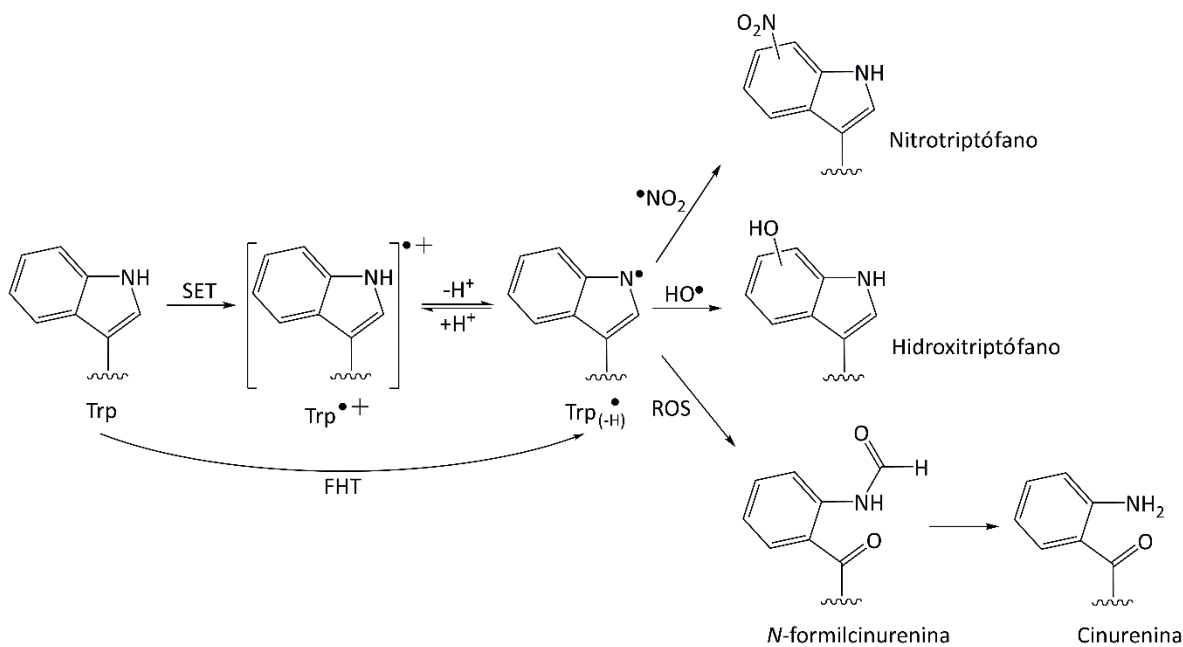
Tabla 2.1. Enzimas generadoras de especies reactivas.

| Enzima | Sustrato | Especies reactivas |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| NADPH oxidasa | NADPH | $O_2^{\bullet-}$ |
| Hemoglobina | O_2 | $O_2^{\bullet-}$ |
| Citocromo P450 | Lípidos, esteroides, xenobióticos | $O_2^{\bullet-}$ |
| Ciclooxigenasa | Ácido araquidónico | ROOH, RO^{\bullet} y HO^{\bullet} |
| Lipooxigenasa | Ácidos grasos | ROOH, RO^{\bullet} y HO^{\bullet} |
| Acil-CoA oxidasa | Acil coenzima A y 3O_2 | H_2O_2 |
| D-amino ácido oxidasa | Ácidos grasos | H_2O_2 |
| L- α -hidroxi oxidasa | D-prolina | H_2O_2 |
| Urato oxidasa | Ácido úrico | H_2O_2 |
| D-aspartato oxidasa | D-aspartato | H_2O_2 |
| Xantina oxidasa | Xantina | $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 |
| Óxido nítrico sintasa | L-arginina | NO^{\bullet} |

2.2. Oxidación de proteínas.

Los residuos de amino ácidos más susceptibles a experimentar procesos de oxidación son la cisteína, metionina, histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina.^[67,68] La oxidación de residuos de cisteína y metionina es reversible, y el mecanismo de reparación es mediado por las enzimas tioredoxina reductasa (Trx)^[69,70] y metionina sulfóxido reductasas (MsrA y MsrB).^[71,72] Por otro lado, el daño sobre residuos de histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina es irreversible, y puede ocasionar la inactivación, fragmentación, y agregación de proteínas, así como la alteración del recambio proteico, conjunto de procesos que pueden inducir el desarrollo de diferentes patologías.^[73-78] Entre los aminoácidos aromáticos, el triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) son los residuos más susceptibles al daño por EO,^[29,79] y a continuación se presentan algunos detalles asociados al daño de dichos aminoácidos.

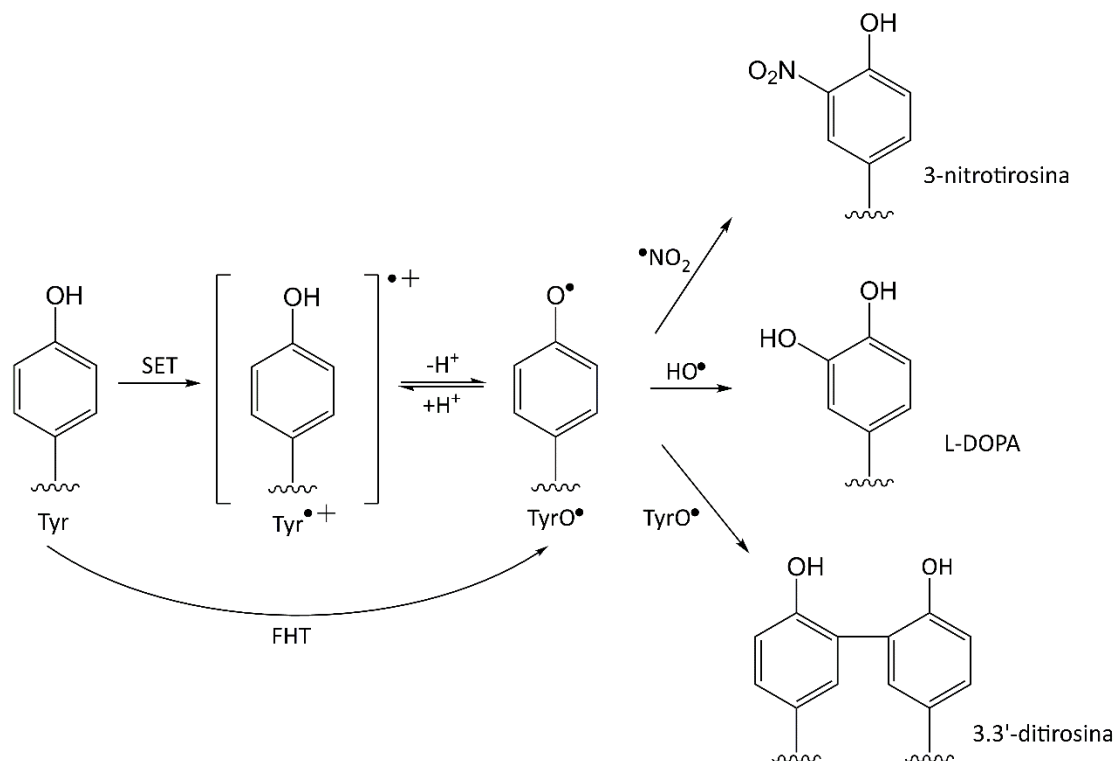
La oxidación de residuos de Trp puede ocurrir a través de dos procesos: transferencia electrónica (*single electron transfer*, SET) o transferencia formal de hidrógeno (*formal hydrogen transfer*, FHT).^[80,81] La oxidación por SET da origen a la formación del catión radical triptofanilo ($Trp^{\bullet+}$),^[82] el cual, a pH fisiológico, se desprotona rápidamente para dar origen a un radical sobre el anillo de indol (radical triptofanilo, $Trp_{(-H)}^{\bullet}$),^[83,84] esquema 2.1. La reacción de Trp con ERO y ERN, produce hidroperóxidos de triptófano, hidroxitriptófano, *N*-formilcinurenina, cinurenina y nitrotriptófano, marcadores reconocidos de EO, esquema 2.1.^[29]



Esquema 2.1. Daño sobre residuos de triptófano mediado por especies reactivas.

La oxidación de Trp puede inducir la agregación no-amiloidea de proteínas, consecuencia del entrecruzamiento por la formación de ditriptófanos y la reacción entre residuos de formilcinurenina y cinurenina.^[85-88] La formación de agregados por la oxidación de residuos de Trp en la enzima superóxido dismutasa, puede estar asociado al desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica.^[85]

La Tyr, de forma similar al Trp, es susceptible al daño inducido por especies reactivas, esquema 2.2., reacciones que pueden ocurrir a través de procesos SET y FHT. La reacción por SET da origen a la formación del catión radical tirosilo ($\text{Tyr}^{\bullet+}$), el cual rápidamente se desprotona para dar origen al radical tirosilo (TyrO^\bullet), i.e., $\text{pK}_a = -2.0$,^[89-93] el cual también puede formarse directamente a través de una reacción FHT.^[29] Algunos productos de la oxidación de residuos de Tyr son el 3-nitrotirosina, *L*-3,4-dihidroxifenilalanina (*L*-DOPA) y la 3,3'-ditirosina.^[29] Actualmente, se propone que la formación de fibras amiloideas, es consecuencia de la formación de 3,3'-ditirosina, por la oxidación de residuos de Tyr en las proteínas β -amiloide y α -sinucleína, procesos de agregación asociado al desarrollo de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, respectivamente.^[94-97] De manera similar, la formación de fibras no-amiloideas por la oxidación de la SOD, proceso asociado al desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica, se encuentra correlacionada con la formación de 3,3'-ditirosina.^[85]



Esquema 2.2. Daño sobre residuos de tirosina mediado por especies reactivas.

Adicional al daño sobre residuos de Trp y Tyr, se ha identificado productos de oxidación de aminoácidos alifáticos como la leucina (Leu) y valina (Val), e.g., la hidroxileucina e hidroxivalina son marcadores de EO en placas ateroscleróticas.^[98] En un estudio realizado por Radom *et al.*, se cuantificó el daño ocasionado por los radicales HO^\bullet y Cl^\bullet sobre los átomos de carbono de 8 aminoácidos proteínogénicos y 5 no-proteínogénicos.^[99] En la figura 2.1 se presentan las velocidades de reacción para los modelos estudiados (relativas a la velocidad de daño de la fenilalanina y terc-leucina por los radicales Cl^\bullet y HO^\bullet , respectivamente). Los resultados demostraron que la Leu es el aminoácido alifático estándar más susceptible al daño por EO, y la reactividad de los átomos de carbono hacia el radical HO^\bullet disminuye en el orden $C_\gamma \gg C_\delta > C_\beta > C_\alpha$, y hacia el radical Cl^\bullet disminuye en el orden $C_\gamma \gg C_\delta > C_\alpha > C_\beta$.

La primera etapa de daño de aminoácidos alifáticos, i.e., la generación de los radicales centrados en átomos de carbono, ocurre a través de reacciones de FHT.^[29,100] Una vez que ocurre la etapa de FHT, puede ocurrir la adición de $^3\text{O}_2$, reacción que da origen a la formación de peróxidos, o puede ocurrir la adición de radicales libres como el radical HO^\bullet , dando origen a la formación de alcoholes.^[68,101-103] Las reacciones de adición mencionadas, ocurren a velocidades controladas por la difusión, i.e., $k \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

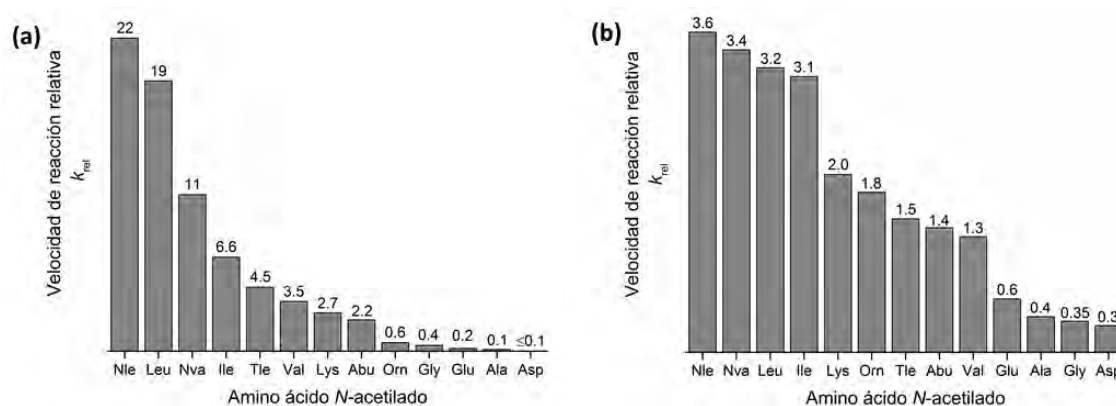
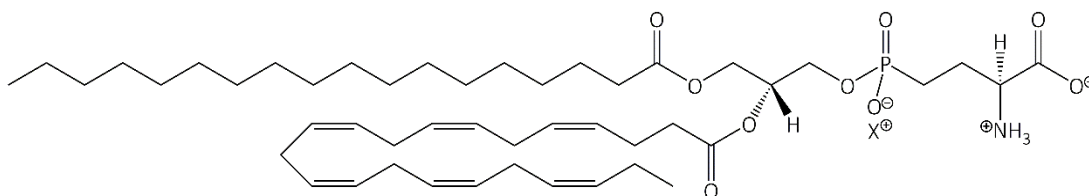


Figura 2.1. Velocidades relativas oxidación (k_{rel}) de α -aminoácidos acetilados (a) en una solución de tetrahidrofurano (THF) saturado con cloro e irradiado con una lámpara de amplio espectro y una potencia de 300 watts [$k_{rel}(\text{Phe}) = 1$] y (b) en agua deuterada y peróxido de hidrógeno, acidificada con THF, irradiada con luz de 254 nm [$k_{rel}(\text{Tle}) = 1$]. Phe = fenilalanina y Tle = terc-leucina.^[99]

2.3. Peroxidación lipídica.

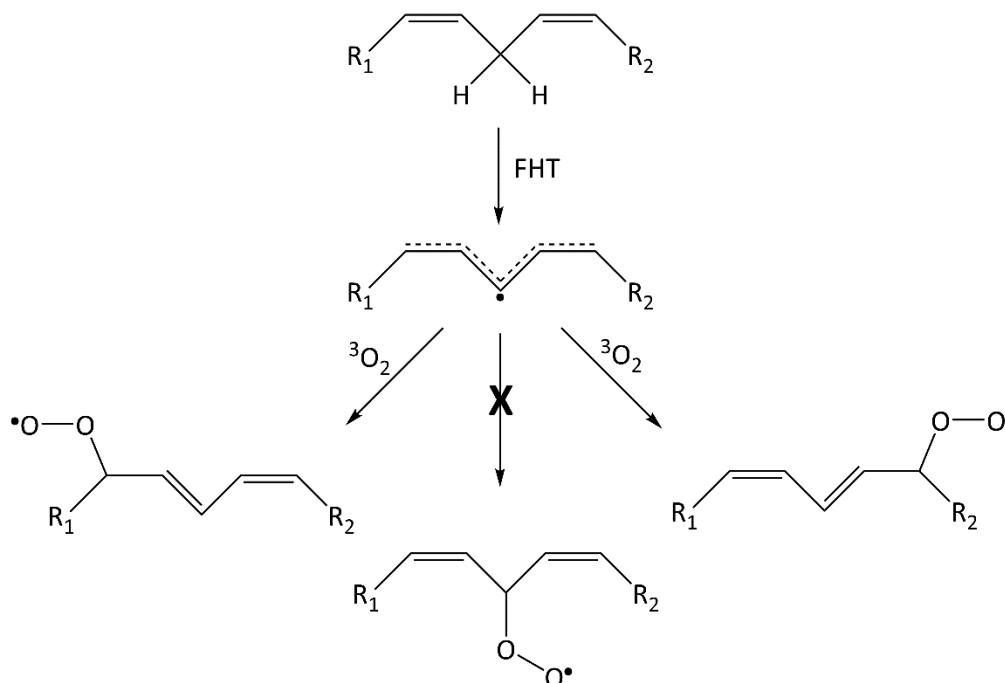
Los lípidos constituyen el ~50% de la masa en membranas celulares de muchos animales, donde se encuentran como fosfolípidos.^[104,105] Los fosfolípidos se caracterizan por poseer una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas. Por lo general, una de las colas hidrofóbicas corresponde a un ácido graso saturado y la otra a un ácido graso polinsaturado (AGPI) y contienen entre 14 y 24 átomos de carbono.^[104-106] La cadena de un AGPI contiene uno o más enlaces dobles C-C en su estructura. Los cuatro fosfolípidos mayoritarios en las membranas de células animales, son la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomiolina, los cuales dan cuenta por más de la mitad de los lípidos presentes en muchas membranas.^[105] El fosfolípido con el mayor número de enlaces dobles C-C es la fosfatidilserina, esquema 2.3.



Esquema 2.3. Estructura del fosfolípido fosfatidilserina, donde X puede ser H⁺, Na⁺, K⁺ y Ca⁺.

Los AGPI son altamente susceptibles a experimentar procesos de oxidación por la acción de radicales libres, proceso denominado peroxidación lipídica.^[29,107] La peroxidación lipídica consta de tres

etapas: iniciación, propagación y terminación. La etapa de iniciación consiste en la FHT desde un grupo CH₂ adyacente a dos enlaces dobles (hidrógeno bis-alílico), proceso que resulta en la formación de un radical libre estabilizado por deslocalización electrónica, esquema 2.4.



Esquema 2.4. Etapa de iniciación de la peroxidación lipídica. Transferencia formal de hidrógeno desde el carbono bis-alílico y segunda etapa, adición de oxígeno.

Una vez que se ha formado el radical sobre el átomo de carbono, puede ocurrir la adición de ³O₂, lo que da origen a la formación de radicales peroxilo capaces de oxidar otros ácidos grasos (auto-oxidación), conjunto de procesos conocidos como etapa de propagación.^[29,107] Los hidroperóxidos formados durante la etapa de propagación se pueden descomponer en diferentes especies reactivas, por ejemplo, el radical alcoxilo (RO•), aldehídos, epóxidos lipídicos y alcoholes.

Finalmente, la etapa de terminación tiene lugar cuando la concentración de radicales peroxilo y radicales centrados en los átomos de carbono, es lo suficientemente alta para que ocurra una reacción de recombinación (reacción radical-radical).^[29]

El proceso de peroxidación lipídica es perjudicial para la célula.^[108,109] Algunos efectos contraproducentes son: el aumento de la rigidez (disminución de la fluidez), disminución de la permeabilidad selectiva, inhibición de enzimas y agregación de proteínas por acción de productos de oxidación solubles en agua que difunden a diferentes compartimentos celulares. Los efectos

acumulativos de la peroxidación lipídica se encuentran relacionados a diferentes patologías, e.g., aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, isquemia y anemia hemolítica. [108,109]

2.4. Reparación química.

Los seres vivos cuentan con sistemas antioxidantes, que se clasifican en dos tipos: antioxidantes primarios y secundarios.^[110] Los antioxidantes primarios (AH) son aquellos compuestos capaces de retrasar o inhibir la etapa de iniciación o interrumpir la etapa de propagación (autoxidación). Es decir, los AH pueden desactivar especies reactivas, reparar los productos iniciales de oxidación (R^\bullet), y radicales asociados a las etapas de propagación (radicales ROO^\bullet y RO^\bullet), a través de reacciones de FHT o SET, procesos que resultan en la generación de productos más estables, reacciones (2.12)-(2.17). Los radicales formados (A^\bullet) son más estables que los productos del estrés oxidativo, no participan en reacciones de propagación, y pueden participar en reacciones de recombinación con otros radicales, i.e., A^\bullet , ROO^\bullet y RO^\bullet , reacciones (2.18)-(2.20).



Los antioxidantes secundarios, a diferencia de los primarios, no convierten radicales libres en moléculas más estables. Su función es preventiva, y se ejerce a través de diferentes mecanismos: quelación de metales con actividad prooxidante, restauran antioxidantes primarios y desactivan el 1O_2 . En algunos casos, los antioxidantes secundarios pueden intensificar la actividad antioxidante de antioxidantes primarios. Antioxidantes como el H_nAsc^q , H_nUr^q , GSH_n^q y αT , son considerados

antioxidantes primarios, y existe evidencia experimental que demuestra la capacidad que tienen de reparar el daño ocasionado por radicales libres sobre residuos de Trp y Tyr en proteínas.^[18-27,111-113]

En la tabla 2.2, se presentan las constantes de velocidad (k , $M^{-1}s^{-1}$), obtenidas experimentalmente por diferentes autores, para las reacciones de reparación de radicales de Trp y Tyr con el H_nAsc^q . Los valores de k para reacciones de reparación de radicales de Trp son del orden de $\sim 10^8 M^{-1}s^{-1}$. En el caso de la reparación del daño sobre residuos de Tyr, la reparación muestra ser dependiente del modelo de estudio. En el caso de Tyr libre y *N*-acetil amida, las k son del orden de $\sim 10^8 M^{-1}s^{-1}$, y para la reparación en proteínas (insulina, quimotripsina, pepsina y β -lactoglobulina) son del orden de $\sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$. Ese resultado sugiere la existencia de algún impedimento estérico en las proteínas estudiadas, fenómeno que resulta en una disminución de las k en comparación a la Tyr libre y la *N*-acetil amida. En general, Las constantes de velocidad recopiladas en la tabla 2.2, demuestran que el H_nAsc^q es un reparador eficiente de radicales de Trp y Tyr.

En la tabla 2.3, se muestran valores k , experimentales, para la reacción de reparación de residuos oxidados de Trp y Tyr mediada por el H_nUr^q . La k de reparación del Trp libre, la *N*-acetil amida y en pepsina son del orden de $\sim 10^7 M^{-1}s^{-1}$, y del orden de $\sim 10^8 M^{-1}s^{-1}$ en quimotripsina. Los valores relacionados a la reparación de Tyr muestran una mayor dependencia en el modelo utilizado. Las k para la reparación de Tyr libre y en pepsina son del orden de $\sim 10^8 M^{-1}s^{-1}$, y para la reparación en quimotripsina es menor que $10^6 M^{-1}s^{-1}$. La k de reparación de Tyr en lisozima, fue determinada para micelas de dodecilsulfato de sodio (SDS), y es del orden de $\sim 10^6 M^{-1}s^{-1}$. Los valores experimentales recolectados en la tabla 2.3 indican que, el H_nUr^q es un reparador eficiente de residuos oxidados de Trp y Tyr.

Las constantes de velocidad experimentales para la reparación de radicales de Trp y Tyr por el GSH_n^q , demostraron que las velocidades de reacción son bajas, en comparación a las reacciones con H_nAsc^q y H_nUr^q , tabla 2.4. Sin embargo, la reparación ocurre a velocidades lo suficientemente altas como para evitar o competir con la adición de 3O_2 sobre los residuos de aminoácidos oxidados, la formación de ditriptófano y ditirosina en proteínas, y la transferencia del daño desde residuos de Trp a residuos de Tyr. Las velocidades de reacción para la adición de 3O_2 sobre los radicales de Trp y Tyr son $< 10^6$ y $< 10^3 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente, para la formación de ditriptófano y ditirosina son $< 10^5 M^{-1}s^{-1}$ (insulina, quimotripsina, pepsina y albúmina de suero bovino), y para la transferencia del daño desde residuos de Trp a residuos de Tyr es $< 10^5 s^{-1}$ (α -lactalbúmina, citocromo *c* peroxidasa, citocromo *c*, *L*-aminoácido oxidasa y lisozima).

Tabla 2.2. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el H_nAsc^q para diferentes modelos de estudios: aminoácidos libres, *N*-acetil amidas y en diferentes proteínas.

| Aminoácido | pH | $k(M^{-1}s^{-1})$ | Autor/año |
|--------------------------------|-----|-------------------|-----------------------|
| | 7.0 | 1.0×10^8 | Packer et al./1981 |
| Trp libre | 7.0 | 9.8×10^7 | Hoey et al./1984 |
| | 7.0 | 1.0×10^8 | Jovanovic et al./1985 |
| <i>N</i> -Ac-Trp amida | 7.4 | 1.4×10^8 | Domazou et al./2009 |
| Trp (lisozima) | 7.0 | 8.3×10^7 | Hoey et al./1984 |
| Trp (quimotripsina) | 7.4 | 1.6×10^8 | |
| Trp (pepsina) | 7.4 | 1.8×10^8 | Domazou et al./2009 |
| Trp (β -lactoglobulina) | 7.4 | 2.2×10^7 | |
| Tyr libre | 7.0 | 4.4×10^8 | Hunter et al./1989 |
| <i>N</i> -Ac-Tyr amida | 7.4 | 2.6×10^8 | Domazou et al./2009 |
| Tyr (insulina) | 7.4 | 2.9×10^7 | |
| Tyr (quimotripsina) | 7.4 | 4.0×10^7 | |
| Tyr (pepsina) | 7.4 | 3.5×10^7 | Domazou et al./2009 |
| Tyr (β -lactoglobulina) | 7.4 | 2.2×10^7 | |

Tabla 2.3. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el H_nUr^q para diferentes modelos de estudios: aminoácidos libres, *N*-acetil amidas y en diferentes proteínas.

| Aminoácido | pH | $k(M^{-1}s^{-1})$ | Autor/año |
|------------------------|-----|--------------------|---------------------|
| Trp | 7.0 | 1.2×10^7 | Hoey et al./1984 |
| <i>N</i> -Ac-Trp amida | 7.4 | 1.9×10^7 | Domazou et al./2012 |
| Trp (pepsina) | 7.4 | $<6.0 \times 10^7$ | |
| Trp (quimotripsina) | 7.4 | 2.7×10^8 | Domazou et al./2012 |
| Tyr | 7.0 | 2.4×10^8 | Hunter et al./1989 |
| Tyr (lisozima-SDS) | 7.0 | 5.4×10^6 | Hoey et al./1984 |
| Tyr (quimotripsina) | 7.4 | $<1.0 \times 10^6$ | |
| Tyr (pepsina) | 7.4 | 3×10^8 | Domazou et al./2012 |

Tabla 2.4. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el GSH_n^q para diferentes modelos de estudios: aminoácidos libres, N-acetil amidas y en diferentes proteínas.

| Aminoácido | pH | $k(M^{-1}s^{-1})$ | Autor/año |
|----------------|-----|-------------------|----------------------------|
| N-Ac-Trp amida | 7.4 | 1.1×10^5 | |
| Trp (pepsina) | 7.4 | 1.1×10^5 | Nauser <i>et al.</i> /2005 |
| N-Ac-Tyr amida | 7.4 | 2.4×10^3 | |
| Tyr libre | 7.4 | 3.5×10^5 | Kirsch <i>et al.</i> /2001 |
| Tyr libre | 7.4 | 2.0×10^6 | Folkes <i>et al.</i> /2011 |

Finalmente, el α T y trolox C (H_nTx^q, el cual es un análogo del α T soluble en medio acuoso), han mostrado ser reparadores eficientes de radicales de Trp y Tyr. En la tabla 2.5 se presentan las k experimentales para los procesos de reparación mediados por esos dos antioxidantes. Las constantes de velocidad indican que, el α T es un reparador eficiente del Trp libre en medio lipídico (SDS) y en lisozima (i.e., k de reparación son del orden de 10^8 y $10^6 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente), pero es incapaz de reparar los residuos de Tyr en lisozima (i.e., k de reparación son del orden de $10^4 M^{-1}s^{-1}$). Por otro lado, el H_nTx^q repara rápidamente los dos aminoácidos en su estado libre, con valores de k de reparación del orden de 10^7 y $10^8 M^{-1}s^{-1}$ para el Trp y Tyr, respectivamente.

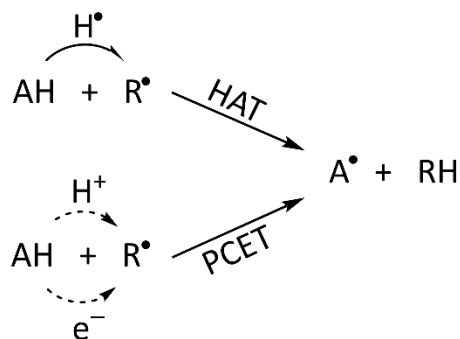
Tabla 2.5. Constantes de velocidad para la reparación de radicales de Trp y Tyr mediada por el α T y H_nTx^q para diferentes modelos de estudios: aminoácidos libres y en lisozima.

| Aminoácido | Reparador | pH | $k(M^{-1}s^{-1})$ | Autor/año |
|--------------------|---------------------|-----|---------------------|-------------------------------|
| Trp libre | Trolox C | 7.0 | 5.2×10^7 | Bisby <i>et al.</i> /1984 |
| Trp libre | Trolox C | 7.0 | 5.6×10^7 | Jovanovic <i>et al.</i> /1985 |
| Trp (SDS) | α -tocoferol | 7.0 | 1.0×10^8 | Hoey <i>et al.</i> /1984 |
| Trp (Lisozima) | α -tocoferol | 7.0 | $< 1.0 \times 10^7$ | Hoey <i>et al.</i> /1984 |
| Tyr libre | Trolox C | 7.0 | 3.8×10^8 | Bisby <i>et al.</i> /1984 |
| Tyr libre | Trolox C | 7.0 | 3.2×10^8 | Davies <i>et al.</i> /1988 |
| Tyr (Lisozima-SDS) | α -tocoferol | 7.0 | 2.6×10^4 | Hoey <i>et al.</i> /1984 |

Con respecto a la reparación de aminoácidos alifáticos, no existen reportes en la literatura con valores experimentales de k para la reacción entre radicales centrados en átomos de carbono y compuestos antioxidantes.

2.5. Mecanismos de reacción de FHT.

Las reacciones FHT, son reacciones donde al menos un átomo de hidrógeno (H^\bullet) es transferido entre dos especies químicas. Al considerar que un H^\bullet se encuentra compuesto por un electrón (e^-) y un protón (H^+), se abre la posibilidad de diferentes vías de transferencia, las cuales pueden ser concertadas o secuenciales.^[80,114-119] Las vías de reacción concertadas, en las que el H^\bullet , se transfiere en una etapa de reacción, son las reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno (*hydrogen atom transfer*, HAT) y transferencia de protón-acoplada a la transferencia de electrón (*proton-coupled electron transfer*, PCET), esquema 2.5. En las reacciones HAT, el e^- y H^+ se mueven como una sola partícula, i.e., como un H^\bullet , y en las reacciones de PCET, el e^- y H^+ se mueven como partículas separadas.



Esquema 2.5. Mecanismos de reacción concertados para las reacciones FHT.

Los dos mecanismos secuenciales de FHT obvios, son las transferencias secuenciales protón-electrón y electrón-protón (*proton-electron sequential transfer* y *electron-proton sequential transfer*, PEST y EPST, respectivamente).^[80]

Una reacción PEST ocurre en tres etapas elementales. Primero, se forma un complejo de pre-reactivos, PEST-1. Segundo, ocurre la transferencia de protón (*proton transfer*, PT) al interior del complejo de pre-reactivos, PEST-2. Y tercero, ocurre la SET al interior del complejo producto de la PT, para posteriormente disociarse en los productos finales, PEST-3. Para un antioxidante donador de H^\bullet (AH), y un radical aceptor de H^\bullet (R^\bullet), el mecanismo PEST puede representarse a través de la siguiente secuencia de reacciones



Una reacción EPST, se puede representar mediante dos etapas elementales,



Primero, ocurre una SET desde AH hacia R^\bullet , EPST-1, y segundo, ocurre la etapa de PT desde el catión radical $\text{AH}^{\bullet+}$ al anión R^- , EPST-2. Sin embargo, a diferencia del mecanismo PEST, una reacción EPST no involucra necesariamente la formación de complejos de SET y PT. Por ejemplo, la etapa de PT puede ser asistida por el solvente, i.e., el anión R^- se protona desde el medio de solvatación. Si la etapa de protonación es asistida por el solvente, se denomina ganancia de protón asistida por el solvente (*solvent assisted proton gain, SAPG*). La extensión con la que puede participar $\text{AH}^{\bullet+}$ en la etapa de protonación del anión R^- , depende de la capacidad donadora de H^+ de $\text{AH}^{\bullet+}$ en comparación al solvente, i.e., si $\text{AH}^{\bullet+}$ es un mejor donador de H^+ en comparación al medio de solvatación entonces su participación en la etapa de PT puede llegar a ser importante.

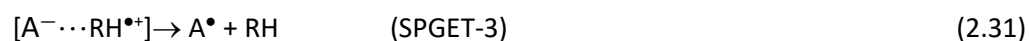
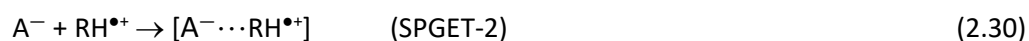
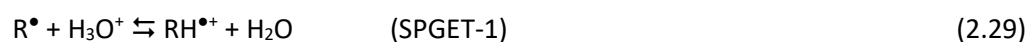
Otro mecanismo secuencial, propuesto por Litwinienko e Ingold, es el mecanismo secuencial de pérdida de protón-transferencia electrónica (*sequential proton loss-electron transfer, SPLET*).^[120-123]



En la primera etapa del mecanismo SPLET, AH participa en una etapa de pérdida de protón asistida por el solvente (*solvent assisted proton loss, SAPL*) y da origen a la formación del anión A^- , el cual es un mejor donador de e^- en comparación a su precursor. En la segunda etapa, ocurre una SET desde A^- hacia R^\bullet , y finalmente, el anión R^- participa en una etapa de SAPG. El mecanismo SPLET es importante para explicar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos, y ha permitido explicar

observaciones experimentales asociadas a la reacción entre el radical DPPH y diferentes compuestos fenólicos.

En el mecanismo SPLET, la pérdida de H^+ modula la capacidad donadora de e^- de AH, lo que sugiere la posible existencia de un mecanismo de reacción en el que la protonación de un radical R^\bullet module sus propiedades redox y favorezca una etapa de SET. Durante el desarrollo del presente trabajo, se pudo confirmar la existencia de dicho mecanismo, y ha sido denominado como reacción secuencial de ganancia de protón-transferencia electrónica (*sequential proton gain-electron transfer*, SPGET). En la primera etapa de un mecanismo SPGET, el radical R^\bullet experimenta un proceso de SAPG, lo que da origen a la formación del catión radical $RH^{\bullet+}$ (SPGET-1). El catión radical $RH^{\bullet+}$ forma un complejo de enlace de hidrógeno con A^- (SPGET-2), al interior del cual ocurre la etapa de SET que da origen a los productos finales (SPGET-3). Si el solvente es agua, el mecanismo SPGET puede representarse por la siguiente secuencia de reacciones elementales

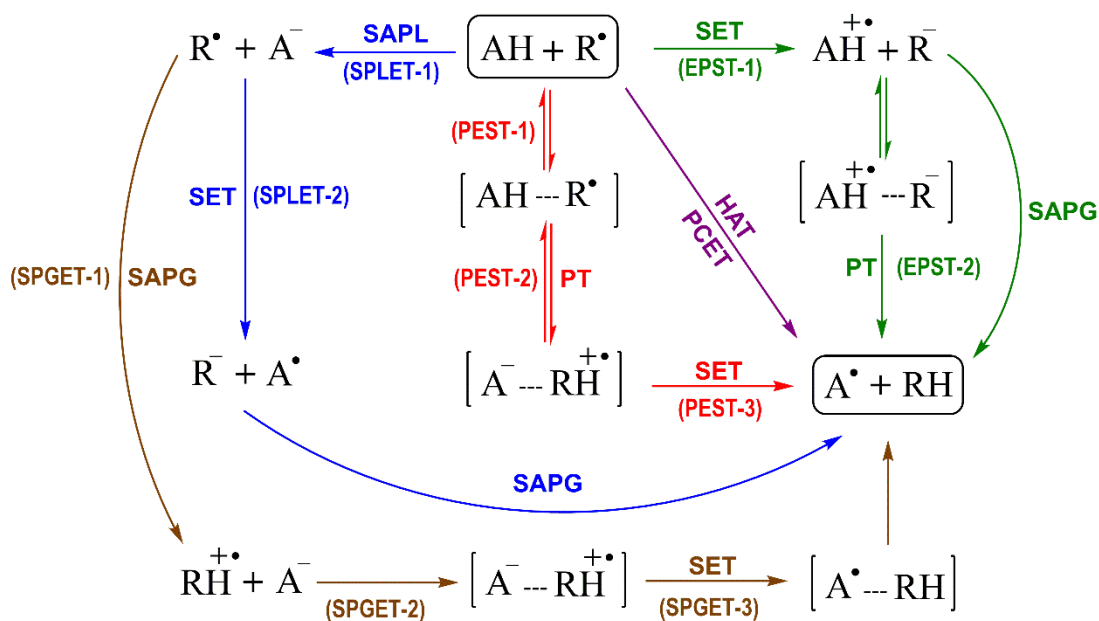


Los mecanismos de reacción HAT, PCET, PEST, EPST, SPLET y SPGET entre un antioxidante AH y un radical R^\bullet , se representan en el esquema 2.6. En dicho esquema, el mecanismo SPGET se representa para la reacción entre R^\bullet y A^- , sin embargo, la etapa SAPL de AH no es esencial para el mecanismo SPGET, i.e., la reacción podría ocurrir entre R^\bullet y AH si sus propiedades redox favorecen el proceso.

El esquema 2.6 refleja la complejidad intrínseca relacionada a la determinación de mecanismos de reacción para sistemas que exhiben equilibrios ácido-base complejos. Descomponer una observación experimental en todas las posibles componentes que contribuyen a la misma, es una tarea compleja que debe ser asistida por métodos de cálculo mecano-cuánticos.

La diferenciación entre los mecanismos de reacción HAT y PCET, puede realizarse con base en análisis de poblaciones de cargas y densidades de espín (sobre el donador, aceptor y núcleo transferido) en función de la coordenada intrínseca de reacción (*intrinsic reaction coordinate*, IRC).^[80,118,119] En la figura 2.2, se presenta el comportamiento de las cargas calculadas mediante un análisis de poblaciones naturales (*natural population analysis*, NPA) y densidades de espín de Hirshfeld para los modelos de HAT y PCET propuestos por Borden *et al.*, i.e., las reacciones de

intercambio de H^\bullet para los sistemas radical bencilo-tolueno ($phCH_2^\bullet/phCH_3$) y radical fenoxilo-fenol ($phO^\bullet/phOH$), respectivamente.^[114] En HAT, la redistribución de carga y espín para el donador y aceptor es menor en comparación a PCET.^[118] Para el núcleo transferido, en HAT se aprecia una densidad de espín considerable ($\sim 5\%$) y una carga pequeña ($\sim 0.25e$), y en PCET, la densidad de espín es despreciable ($\sim 0\%$) y la carga es mayor ($\sim 0.5e$) en comparación a HAT^[119]



Esquema 2.6. Posibles mecanismos de reacción de transferencia formal de hidrógeno. AH = antioxidante, R^\bullet = radical libre, SET = *single electron transfer*, PT = *proton transfer*, SAPL = *solvent assisted proton loss*, SAPG = *solvent assisted proton gain*, HAT = *hydrogen atom transfer*, PCET = *proton coupled-electron transfer*, PEST = *proton-electron sequential transfer*, EPST = *electron-proton sequential transfer*, SPLET = *sequential proton loss-electron transfer*, SPGET = *sequential proton gain-electron transfer*.

Los análisis de poblaciones de cargas y espín, han demostrado ser útiles para identificar reacciones secuenciales.^[80] En tales casos, la densidad de espín y cargas para el donador y aceptor, no presentan la inversión que se observa en la figura 2.2, y los orbitales frontera (*highest occupied molecular orbital*, HOMO, y *single occupied molecular orbital*, SOMO), permiten confirmar el carácter secuencial, e.g., en el mecanismo PEST los orbitales HOMO y SOMO permanecen localizados sobre el donador y aceptor, respectivamente.^[80]

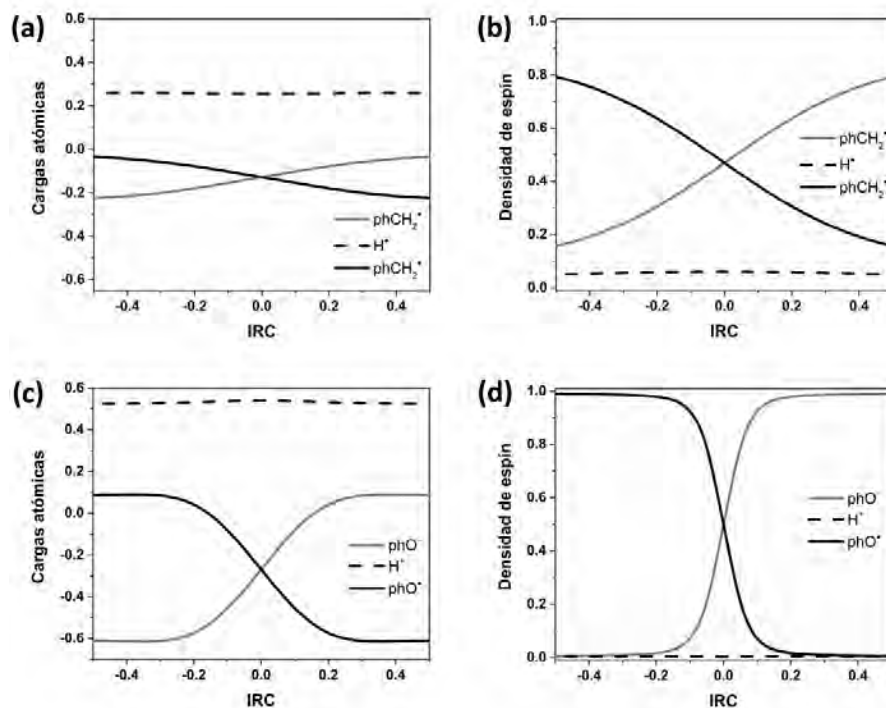


Figura 2.2. Variación de cargas NPA y densidad de espín de Hirshfeld para los modelos de HAT y PCET. Evolución de (a) cargas y (b) espín en función del IRC para el sistema modelo $\text{phCH}_2^\bullet/\text{phCH}_3$, y evolución de (c) cargas y (d) espín en función del IRC para el sistema modelo $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$. Los cálculos se realizaron utilizando el funcional M05-2X y el conjunto de funciones base 6-31+G(d,p).

Los análisis de cargas y espín en función de la IRC, es una de las principales herramientas utilizadas en el desarrollo del presente trabajo. Los resultados obtenidos confirman la existencia de diferentes mecanismos de reacción relacionados a la reparación química de radicales de Trp, Tyr y Leu por los antioxidantes primarios $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{a}}$, $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{a}}$, GSH_n^{a} y $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{a}}$.

3. Marco teórico.

En la actualidad, existen diferentes métodos computacionales enfocados a solucionar problemas químicos con base en cálculos mecano-cuánticos.^[2,12-14] Entre los métodos de cálculo disponibles, la teoría de los funcionales de la densidad (*density functional theory*, DFT) es utilizada ampliamente en el estudio de reactividad, ya que permite determinar la viabilidad termodinámica de reacciones, constantes de velocidad de reacción y mecanismos de reacción.

Un ejemplo de la aplicabilidad de DFT en el estudio de la reactividad, es proporcionado por la metodología QM-ORSA (*quantum mechanics-based test for overall free radical scavenging activity*), la cual permite estimar la constante de velocidad total asociada a sistemas químicos complejos en disolución.^[15] En la metodología QM-ORSA, las constantes de velocidad de reacción se calculan con base en la teoría convencional del estado de transición, incluye las correcciones asociadas a la degeneración de los caminos de reacción, efectos de tunelaje, el estado estándar 1M, efectos de la caja de solvente y correcciones a reacciones controladas por difusión. Las reacciones de transferencia electrónica se estudian con base en la teoría de Marcus. El desempeño de la metodología QM-ORSA ha sido evaluado, utilizando 18 funcionales de la densidad y 19 reacciones entre radicales libres y moléculas de capa cerrada, y los resultados demostraron que el error medio absoluto utilizando el funcional M05-2X, el conjunto de funciones base de Pople 6-311++G(d,p) y el modelo de solvatación continuo SMD, es ~ 1.2 kcal/mol.^[124]

En este capítulo, se discuten algunos detalles teóricos asociados a la teoría de los funcionales de la densidad y la metodología QM-ORSA.

3.1. Teoría de los funcionales de la densidad: DFT.

El teorema de existencia de Hohenberg-Kohn demuestra que, la densidad electrónica del estado basal $\rho(r)$ de una molécula determina el potencial externo (potencial de atracción núcleo-electrón, V_{ne}) y el número de electrones, y, por lo tanto, determina el Hamiltoniano electrónico, la función de onda, la energía y otras propiedades moleculares del estado basal.^[2,125] Con base en dicho teorema de existencia, Kohn y Sham propusieron un método práctico para calcular $\rho(r)$ y obtener la energía para un sistema de referencia ficticio de electrones que no interactúan, los cuales se encuentran bajo la acción del mismo potencial externo. Por lo tanto, con base en la aproximación de Kohn y Sham, la energía electrónica del estado basal puede expresarse como un funcional de la densidad electrónica, i.e., $E = E[\rho(r)]$, ecuación 3.1.

$$E[\rho(r)] = T_{ni}[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + \Delta T[\rho(r)] + \Delta V_{ee}[\rho(r)] \quad (3.1)$$

donde $T_{ni}[\rho(r)]$ es la energía cinética para un sistema de electrones que no interactúan, $V_{ne}[\rho(r)]$ es el potencial externo, $V_{ee}[\rho(r)]$ es la repulsión electrón-electrón clásica, y los dos últimos términos son la corrección a la energía cinética debida a la interacción entre electrones y las correcciones no-clásicas a la energía de repulsión electrón-electrón, respectivamente. Al expresar la densidad en términos de orbitales, la ecuación (3.1) se puede reescribir como

$$E[\rho(r)] = \sum_i^N \left(\left\langle \varphi_i \left| -\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right| \varphi_i \right\rangle - \left\langle \varphi_i \left| \sum_k^M \frac{Z_k}{|r_i - r_k|} \right| \varphi_i \right\rangle \right) + \sum_i^N \left\langle \varphi_i \left| \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r')}{|r_i - r'|} dr' \right| \varphi_i \right\rangle + E_{xc}[\rho(r)] \quad (3.2)$$

donde N y M corresponden al número de electrones y núcleos, respectivamente, y se ha utilizado la función de onda asociada a un determinante de Slater

$$\rho = \sum_{i=1}^N \langle \varphi_i | \varphi_i \rangle \quad (3.3)$$

donde φ_i son orbitales moleculares construidos como una combinación lineal de funciones base. En la ecuación (3.2), los términos ΔT y ΔV_{ee} se encuentran reunidos en $E_{xc}[\rho(r)]$, que se denomina la energía de intercambio-correlación. La expresión matemática exacta de E_{xc} es desconocida, y el principal esfuerzo asociado al desarrollo de DFT, corresponde a la determinación de funciones de la densidad que permitan determinar el valor de E_{xc} de forma aproximada.

Para un sistema de capa abierta, el cual contiene uno o más orbitales moleculares semillenos, la densidad electrónica de los electrones α y β se consideran por separado. Por lo tanto, la energía cinética y energías de intercambio y correlación, asociadas a los electrones α y β , se tratan de forma independiente, y las energías de repulsión electrón-electrón y potencial externo, se calculan para la densidad total.

3.1.2. Método de campo auto-consistente de Kohn-Sham.

Es posible minimizar la energía de los orbitales φ_i en la ecuación (3.2), a través de un método iterativo análogo al campo auto-consistente de Hartree-Fock. En DFT, el operador Fock es reemplazado por el operador mono-electrónico de Kohn-Sham (KS)^[12,13]

$$h_i^{KS} = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_k \frac{Z_k}{|r_i - r_k|} + \int \frac{\rho(r')}{|r_i - r'|} dr' + V_{xc} \quad (3.4)$$

y

$$V_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho} \quad (3.5)$$

Donde V_{xc} es llamado la derivada funcional, el cual es un operador mono-electrónico que, al operar sobre el determinante de Slater construido con los orbitales de KS (θ_i^{KS}), proporciona el valor esperado E_{xc} .

Para determinar los orbitales θ_i^{KS} , primero se debe resolver la ecuación secular utilizando el operador h_i^{KS} . Segundo, se determinan los coeficientes para la combinación lineal de funciones bases que conforman los orbitales θ_i^{KS} . Y, finalmente, se construye el determinante de Slater utilizando los θ_i^{KS} . La primera y segunda etapa, se realizan de forma iterativa hasta que el cálculo cumple con el criterio de convergencia establecido, lo que permite obtener la densidad electrónica óptima, y, por lo tanto, el valor de mínima energía para el estado basal del sistema.

3.1.3. Funcionales de intercambio-correlación: E_{xc} .

El funcional de intercambio-correlación E_{xc} puede ser expresado como la suma de un funcional de energía de intercambio E_x y un funcional de la energía de correlación E_c ,^[2]

$$E_{xc} = E_x + E_c \quad (3.6)$$

Los funcionales E_x y E_c pueden depender de diferentes variables, lo que determina el grado de exactitud de un funcional E_{xc} particular. Las variables pueden ser la densidad electrónica (ρ), el gradiente de la densidad electrónica ($\nabla\rho$), el laplaciano de la densidad electrónica ($\nabla^2\rho$), la densidad de energía cinética del orbital (τ), el intercambio exacto Hartree-Fock (E_x^{HF}), y la inclusión de orbitales virtuales de KS.^[2,12-14] En la tabla 3.1 se presenta la clasificación realizada por Perdew con base en las variables que se utilizan para el diseño de los funcionales E_{xc} , clasificación conocida comúnmente como la escalera de Jacob, y se incluyen algunos ejemplos de cada nivel.^[2]

El funcional utilizado, para el desarrollo de los cálculos presentados en este trabajo, es el funcional hiper-GGA M05-2X (cuarto escalón de Jacob).^[126] El funcional M05-2X considera 56% de intercambio

exacto E_x^{HF} , incluye como variables ρ , $\nabla\rho$ y τ en las ecuaciones asociadas a E_x y E_c , y ha sido parametrizado (23 parámetros optimizados) para realizar cálculos de termoquímica, cinética e interacciones no-covalentes. Los errores promedio reportados por Zhao y Truhlar, para los cálculos de termoquímica, cinética e interacciones no-covalentes son 0.93, 0.99 y 0.33 kcal/mol, respectivamente. Por lo tanto, el desempeño del funcional M05-2X, lo convierte en un funcional adecuado para el cálculo de reacciones en sistemas biológicos, donde se espera que las interacciones no-covalentes jueguen un papel sumamente importante, i.e., enlaces de hidrógeno e interacción π - π *stacking*.

Tabla 3.1. Clasificación de Perdew de los funcionales de intercambio-correlación.

| Nivel | Nombre | Variables | Ejemplos |
|-------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | Densidad local | ρ | LDA, LSDA, X_α |
| 2 | GGA | $\rho, \nabla\rho$ | BLYP, OLYP, PW86, PBE |
| 3 | Meta-GGA | $\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho$ o τ | B95, PKZB, TPSS, τ -HCTH |
| 4 | Hiper-GGA | $\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho$ o τ , intercambio HF | B3LYP, PBE0, TPSSh, M05-2X |
| 5 | RPA generalizado | $\rho, \nabla\rho, \nabla^2\rho$ o τ , intercambio HF, orbitales virtuales | OEP2, B2-PLYP, mPW2-PLYP |

3.2. Funciones base.

Los orbitales moleculares, los cuales son funciones desconocidas, se pueden representar como una expansión de funciones bases conocidas. El tipo de funciones base utilizadas para representar los orbitales moleculares, tiene influencia sobre la exactitud con la que se representa un sistema molecular. Existen dos tipos de funciones bases utilizadas comúnmente en cálculos de estructura electrónica: los orbitales tipo Slater (STO) y tipo gaussiano (GTO). En este trabajo se han utilizado funciones base GTO, y a continuación se discuten algunas características asociadas a estas.

3.2.1. Orbitales tipo gaussiano: GTO.

Las funciones base GTO pueden ser escritas en coordenadas cartesianas como se muestra en la ecuación (3.7).^[2]

$$\chi(\zeta, l_x, l_y, l_z) = N x^{l_x} y^{l_y} z^{l_z} e^{-\zeta r^2} \quad (3.7)$$

La suma de los valores de l_x , l_y y l_z determinan el tipo de orbital, e.g., $l_x + l_y + l_z = 1$ corresponde a un orbital p . La dependencia exponencial en r^2 , conlleva ciertos problemas al momento de describir los comportamientos esperados: la pendiente de las funciones GTO es cero sobre el núcleo y decae muy rápidamente con la separación al núcleo (figura 3.1). Por esas razones, en comparación a otras funciones base (por ejemplo, las funciones base de Slater, STO) se requiere un número mayor de funciones GTO con el fin de obtener un buen grado de exactitud. En la figura 3.1 se presenta la comparación entre una función base de Slater (STO, las cuales presentan el comportamiento adecuado sobre las posiciones nucleares y con la separación a dichas posiciones) y una función STO-3G, la cual corresponde a la suma de tres funciones GTO (GTO-1, GTO-2, GTO-3). El incremento en el número de funciones GTO es compensado por la facilidad asociada a la integración de tales funciones.

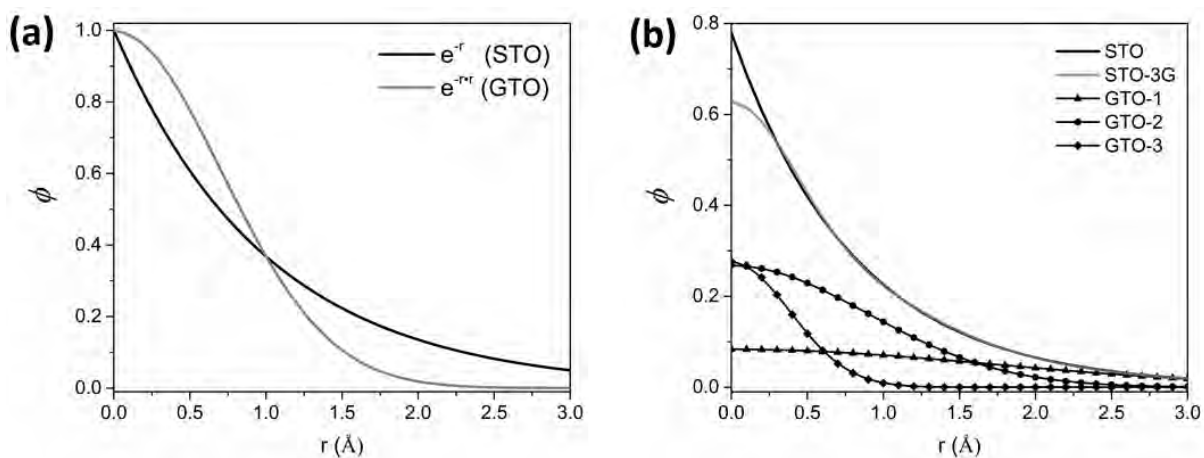


Figura 3.1. Comportamiento de las funciones STO y GTO. (a) Comparación de entre una función STO y una función GTO. (b) Construcción de una función STO-3G por la suma de tres funciones GTO (GTO-1, GTO-2 y GTO-3) y comparación con una función STO.

Normalmente, las funciones GTO se consideran centradas sobre los núcleos, sin embargo, para ciertos tipos de cálculos, puede ser conveniente que no coincidan precisamente con los núcleos, y se pueden encontrar centradas entre dos átomos enlazados, con el fin de mejorar la descripción de un enlace, o entre átomos no enlazados, mejorando la descripción de interacciones de van der Waals.

3.2.2. Funciones doble y triple zeta.

Cuando se describe el orbital molecular como una combinación de un conjunto de funciones de base, el orbital se refiere a una molécula y las funciones de base son orbitales atómicos centrados en los átomos de ésta, aproximación que se conoce como MO-LCAO (*Molecular Orbitals as Linear Combination of Atomic Orbitals*).^[12] Según las ecuaciones de Roothaan, el conjunto de funciones atómicas debe ser infinito para llegar a la mejor función de onda variacional,^[13] ecuación 3.8.

$$\varphi_i = \sum_{\mu}^{\infty} c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (3.8)$$

En la práctica esto es imposible, por lo que se usan diferentes grados de truncamiento y el número de funciones base utilizadas para representar los orbitales moleculares, da origen a diferentes clasificaciones de las funciones base. Si se utiliza un número de funciones GTO que únicamente pueda contener el número de electrones de los átomos que constituyen el sistema, se dice que se utiliza un conjunto de base mínima. Por ejemplo, para el átomo de hidrógeno y helio, se utiliza una función 1s, y para la primera fila de la tabla periódica, dos funciones s (1s y 2s) y un conjunto de funciones p (2p_x, 2p_y y 2p_z).^[2]

Si se duplica o triplica el número de funciones base de una base mínima, se obtienen funciones doble zeta (DZ) y triple zeta (TZ), respectivamente, las cuales representan una mejora sobre un conjunto de base mínima.^[2] Por ejemplo, una función DZ para el átomo de hidrógeno y helio, incluye dos funciones s (1s y 1s'), y para la primera fila de la tabla periódica, cuatro funciones s (1s, 1s', 2s y 2s') y dos conjuntos de funciones p (2p y 2p'). Adicional a funciones DZ y TZ, también existen funciones cuádruple zeta (QZ) y quintuple zeta (PZ o 5Z).

En la actualidad, las funciones asociadas a los electrones internos no son aumentadas en las funciones DZ, TZ, QZ o PZ, y únicamente se aumenta el número de funciones relacionadas a los electrones de valencia, y se denominan funciones base de valencia desdoblada (*Split valence function*). La razón para esto, es que los orbitales internos no participan del enlace químico, que es lo que se pretende describir.

3.2.3. Contracción de funciones bases.

Las funciones base utilizadas normalmente en cálculos de estructura electrónica, corresponden a una combinación lineal de funciones base, como se muestra en la ecuación (3.9).

$$\varphi_{\zeta, l_x, l_y, l_z} = \sum_{a=1}^M c_a \chi(\zeta_a, l_x, l_y, l_z) \quad (3.9)$$

donde M es el número de funciones GTO, y los coeficientes c_a se seleccionan de forma que optimicen la forma de las funciones base y se garantice la normalización. Cuando las funciones base GTO presentan la forma de la ecuación (3.9), se denominan funciones base “contraídas”, las funciones desde las cuales se construyen, se denominan gaussianas “primitivas”, y el grado de contracción se refiere al número de primitivas utilizadas en la construcción de la función contraída.

3.2.4. Funciones de polarización y difusas.

Existen casos donde la flexibilidad matemática asociada a funciones base del tipo de los orbitales de valencia centrados en los átomos, no es suficiente para describir determinadas propiedades moleculares. Por lo tanto, la flexibilidad necesaria en dichos casos, se adiciona en forma de funciones base con un número cuántico de alto momento angular, denominadas funciones de polarización.^[2,12-14] Para la primera y segunda fila de la tabla periódica, las funciones de polarización más útiles son las funciones GTO d , y para un átomo de hidrógeno las funciones GTO p . En la figura 3.2 se muestra como una función de polarización d puede polarizar una función p y mejorar la descripción de un enlace en una molécula determinada.

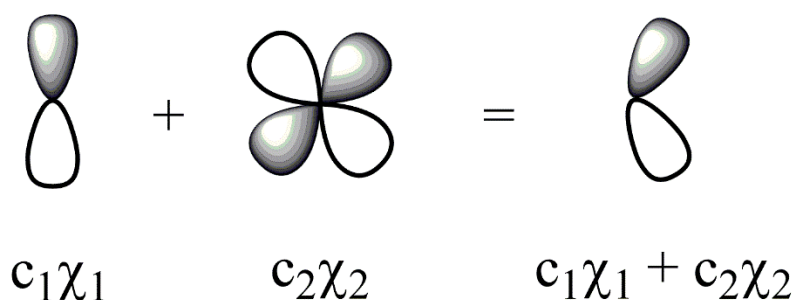


Figura 3.2. Polarización de una función p (χ_2) por la adición de una función d (χ_1).

Adicionalmente, si las funciones bases no tienen la flexibilidad necesaria para permitir que los electrones débilmente enlazados (e.g., aniones y estados excitados) se localicen en regiones lejanas de la densidad electrónica, se pueden adicionar funciones difusas, las cuales corresponden a

funciones bases s y p de gran tamaño.^[2,12-14] Por lo general, las funciones difusas tienen exponentes alrededor de cuatro veces más pequeños que el exponente más pequeño de las funciones base para los electrones de valencia.

3.2.5. Funciones base de Pople.

Las bases de Pople *et al.* son funciones de valencia desdoblada utilizadas ampliamente en cálculos de estructura electrónica.^[12] Algunos ejemplos son las funciones 3-21G, 6-21G, 4-31G, 6-31G y 6-311G, donde la nomenclatura da información relacionada al esquema de contracción. El primer número indica el número de primitivas utilizadas para las funciones contraídas de los orbitales atómicos internos, y los números después del guion, indica el número de primitivas utilizadas para representar los orbitales atómicos de valencia. Si después del guion hay dos números, las funciones base son DZ, y si hay tres números, las funciones bases son TZ.

Por ejemplo, la función 6-31G indica que los orbitales atómicos internos se representan mediante la contracción de seis funciones GTO, y los orbitales de valencia se representan mediante la suma de dos funciones, una función generada por la contracción de tres primitivas y una GTO simple.

Las funciones de Pople *et al.*, pueden ser aumentadas con funciones de polarización y difusas con el fin de mejorar la descripción de un sistema molecular, como se discutió anteriormente. La nomenclatura utilizada por Pople *et al.* para la adición de funciones difusas, es representada por un * (asterisco). Por ejemplo, para la función DZ 6-31G**, el primer * indica que se adicionó un grupo de funciones de polarización d sobre los átomos pesados, y el segundo * indica que se adicionó un grupo de funciones de polarización p sobre átomos de H y He. Otra forma de representar la función 6-31G**, corresponde a 6-31G(d,p).

Para las funciones de Pople *et al.*, la adición de funciones difusas se representa por el signo + (signo más). Por ejemplo, la función 6-311++G, corresponde a un grupo de funciones base TZ para la cual se ha adicionado una función difusa s y un conjunto de funciones difusa p para átomos pesados (primer signo +), y una función difusa s para los átomos de H (segundo signo +).

Para el desarrollo de los cálculos presentados en este trabajo, se ha utilizado el grupo de funciones base DZ 6-31+G(d,p), las cuales presentan el balance adecuado entre el esquema de contracción y la adición de funciones de polarización. El uso de funciones difusas s y p sobre átomos pesados, suministra la flexibilidad necesaria para estudiar moléculas aniónicas, describir la ruptura y formación de enlaces, así como la presencia de interacciones no-covalentes, i.e., enlaces de

hidrógeno e interacciones π - π *stacking*. Adicionalmente, se han seleccionado funciones base DZ, debido al tamaño de los sistemas estudiados en este trabajo, por ejemplo, el estado de transición calculado para la reacción entre el radical de triptófano y glutatión contiene 66 átomos. Finalmente, en la literatura y en particular en los trabajos de los desarrolladores del funcional utilizado, se recomienda el uso de las funciones base de Pople para el desarrollo de cálculos DFT, ya que en comparación con otros tipos de funciones bases (e.g., funciones base de Dunning), proporcionan mejores resultados a un menor costo computacional.^[127]

3.3. Métodos de solvatación.

El efecto del solvente se puede considerar de forma explícita o implícita. Para considerar explícitamente el efecto del solvente en una reacción química, se deben incluir las moléculas de solvente en el cálculo, i.e., las coordenadas atómicas de las moléculas de solvente son tratadas explícitamente. Sin embargo, el tratamiento mecano-cuántico de un sistema con solvatación explícita, se hace demasiado costoso computacionalmente. Para superar el problema del tamaño del sistema, asociado a la inclusión de moléculas explícitas de solvente, se pueden utilizar los métodos de solvatación implícita, donde se considera el solvente como un medio polarizable uniforme con una constante dieléctrica ϵ y con el soluto M ubicado en una cavidad en el medio polarizable, i.e., el detalle atómico del solvente es reemplazada por una descripción promediada en la cual el solvente es tratado matemáticamente como un medio continuo, figura 3.3.^[2,128]

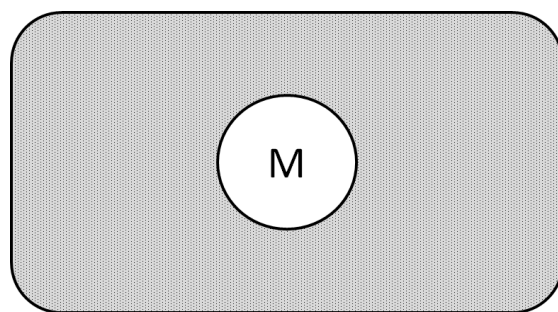


Figura 3.3. Representación esquemática de un medio de solvatación implícito.

La energía libre de solvatación ($\Delta G_{solvatación}$) se puede obtener desde la contribución de tres energías libres, ecuación (3.10).^[2]

$$\Delta G_{solvatación} = \Delta G_{cavidad} + \Delta G_{dispersión} + \Delta G_{eléctrica} \quad (3.10)$$

donde $\Delta G_{cavidad}$, $\Delta G_{dispersión}$ y $\Delta G_{eléctrica}$ son las energías libres asociadas a la generación de la cavidad, interacciones dipolo-dipolo entre el solvente y soluto, y la polarización del medio continuo de solvatación inducida por la distribución de carga del soluto.

Para el desarrollo de los cálculos presentados en este trabajo, se utilizó el método de solvatación continuo SMD (la D se refiere a *density*), el cual se basa en la densidad de carga mecano-cuántica de una molécula de soluto interactuando con un solvente descrito como un continuo polarizable.^[129] SMD es considerado un modelo de solvatación *universal*, ya que su aplicabilidad se extiende a cualquier soluto neutro o cargado en cualquier solvente para el cual se conozca la constante dieléctrica, índice de refracción, tensión superficial, y parámetros de acidez y basicidad. El modelo separa el valor de $\Delta G_{solvatación}$ en dos componentes principales, una componente asociada a la contribución electrostática desde el seno de la disolución, y la otra asociada a las interacciones de corto alcance entre las moléculas de soluto y solvente en la primera esfera de solvatación. La cavidad para el soluto es definida por la superposición de esferas centradas en los núcleos del soluto.

El modelo SMD ha sido parametrizado utilizando un conjunto de entrenamiento de 2821 datos de solvatación que incluye 112 energías libres de solvatación de iones en medio acuoso, 220 energías libres para 166 iones en acetonitrilo, metanol y dimetilsulfóxido, 2346 energías libres de solvatación para 318 solutos neutros en 91 solventes (90 solventes orgánicos y agua), y 143 energías libres de transferencia entre agua y 15 solventes orgánicos para 93 solutos neutros. Los solutos utilizados contienen en sus estructuras, los elementos H, C, N, O, F, Si, P, S, Cl y Br. Los parámetros necesarios para el desarrollo del modelo SMD (los radios atómicos y coeficientes atómicos de tensión superficial) fueron optimizados por seis métodos de estructura electrónica: M05-2X/MIDI!6D, M05-2X/6-31G*, M05-2X/6-31+G**, M05-2X/cc-pVTZ, B3LYP/6-31G* y HF/6-31G*.

3.4. Análisis de poblaciones.

La asignación de cargas a los átomos que constituyen una molécula, implica el cálculo de electrones que pertenece a cada átomo, y se denomina análisis de poblaciones. A continuación, se discuten algunos detalles asociados al análisis de poblaciones de Mulliken, el análisis de población natural (NPA) y análisis de poblaciones de Hirshfeld.

3.4.1. Análisis de poblaciones de Mulliken.

El análisis de poblaciones introducido por Mulliken,^[14,130] ha sido utilizado ampliamente en el análisis de orbitales moleculares. El método permite repartir los n -electrones de una molécula en una

población neta n_r para las funciones base χ_r y en poblaciones de solapamiento n_{r-s} para todos los posibles pares de funciones base.

El orbital molecular φ_i se pueden expresar en términos de las funciones base $\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_b$ como se muestra en la ecuación (3.11).

$$\varphi_i = \sum_{s=1}^b c_{si} \chi_s = c_{1i} \chi_1 + c_{2i} \chi_2 + \dots + c_{bi} \chi_b \quad (3.11)$$

Por lo tanto, la densidad de probabilidad asociada con un electrón en el orbital φ_i se expresa como:

$$|\varphi_i|^2 = c_{1i}^2 + c_{2i}^2 + \dots + 2c_{1i}c_{2i}\chi_1\chi_2 + 2c_{1i}c_{3i}\chi_1\chi_3 + 2c_{2i}c_{3i}\chi_2\chi_3 + \dots \quad (3.12)$$

Al integrar la ecuación (3.12) sobre el espacio tridimensional y considerando el hecho de que φ_i y las funciones base χ_r están normalizadas, se obtiene la ecuación (3.13).

$$1 = c_{1i}^2 + c_{2i}^2 + \dots + 2c_{1i}c_{2i}S_{12} + 2c_{1i}c_{3i}S_{13} + 2c_{2i}c_{3i}S_{23} + \dots \quad (3.13)$$

donde S son las integrales de solapamiento, i.e., $S_{12} = \int \chi_1 \chi_2 dr_1 dr_2$, etc. De acuerdo al análisis de poblaciones de Mulliken, un electrón en el orbital φ_i contribuye c_{1i}^2 a la población neta de χ_1 , c_{2i}^2 a la población neta de χ_2 , etc., y contribuye $2c_{1i}c_{2i}S_{12}$ a la población de solapamiento entre χ_1 y χ_2 , $2c_{1i}c_{3i}S_{13}$ a la población de solapamiento entre χ_1 y χ_3 , etc.

Al considerar que n_i es el número de electrones en el orbital φ_i ($n_i = 0, 1, 2$), y que $n_{r,i}$ y $n_{r-s,i}$ simboliza la contribución de los electrones en el orbital molecular φ_i a la población neta de χ_r y la población de solapamiento entre χ_r y χ_s , respectivamente, se obtienen las ecuaciones (3.14) y (3.15).

$$n_{r,i} = n_i c_{ri}^2 \quad (3.14)$$

$$n_{r-s,i} = n_i (2c_{ri}c_{si}S_{rs}) \quad (3.15)$$

Al realizar la suma sobre todos los orbitales ocupados φ_i , se obtiene la población neta de Mulliken n_r en χ_r y la población de solapamiento n_{r-s} para los pares $\chi_r \chi_s$, como se muestra en las ecuaciones (3.16) y (3.17).

$$n_r = \sum_i n_{r,i} \quad (3.16)$$

$$n_r = \sum_i n_{r-s,i} \quad (3.17)$$

La suma de todas las poblaciones determinadas mediante las ecuaciones (3.16) y (3.17), es igual al número total de electrones n en la molécula, i.e., $\sum_r n_r + \sum_{r>s} \sum_s n_r = n$.

Al desdoblar por igual cada población de solapamiento n_{r-s} para las funciones base χ_r y χ_s , se puede obtener la población bruta N_r en χ_r , como se muestra en la ecuación (3.18).

$$N_r = n_r + \frac{1}{2} \sum_{s \neq r} n_{r-s} \quad (3.18)$$

La suma sobre todos los valores de N_r es igual al número de electrones en la molécula: $\sum_{r=1}^b N_r = n$.

La suma de todas las poblaciones brutas N_r centradas sobre un átomo B , suministra la población bruta N_B para el átomo B , ecuación (3.19).

$$N_B = \sum_{r \in B} N_r \quad (3.19)$$

donde $r \in B$ denota todas las funciones base centradas sobre el átomo B . La suma de las poblaciones brutas sobre cada átomo, es igual al número de electrones n en la molécula. La carga atómica neta q_B para el átomo B con número atómico Z_B , se define como:

$$q_B \equiv Z_B - N_B \quad (3.20)$$

Es importante comentar que, el análisis de poblaciones de Mulliken, en muchos casos, proporciona valores sin sentido físico (e.g., en algunos casos asigna más de dos electrones o un número negativo de electrones a un determinado orbital), depende de las funciones base utilizadas, y falla en la descripción de la distribución de cargas de compuestos con un carácter iónico significativo.

3.4.2. Análisis de población natural.

El análisis de población natural (*natural population analysis*, NPA), para algunos estudios, suministra mejores resultados que el análisis de poblaciones de Mulliken.^[2,131] Para realizar un análisis NPA, es necesario calcular los orbitales atómicos naturales (*natural atomic orbital*, NAO), los cuales permiten definir la forma de los orbitales atómicos en el ambiente molecular. Las cargas netas obtenidas mediante el NPA, presentan una dependencia menor de las funciones bases utilizadas para realizar el cálculo, razón por la cual se recomienda su uso en preferencia al análisis de poblaciones de Mulliken.

Para obtener los NAO, el primer paso es ordenar las funciones base de tal forma que, todos los orbitales localizados sobre el átomo A se encuentren antes que los orbitales localizados sobre el átomo B , los cuales se encuentran antes de los orbitales localizados sobre el átomo C , etc., como se muestra a continuación:

$$\chi_1^A, \chi_2^A, \chi_3^A, \dots, \chi_k^B, \chi_{k+1}^B, \chi_{k+2}^B, \dots, \chi_n^C, \chi_{n+1}^C, \chi_{n+2}^C, \dots$$

La matriz de densidad puede expresarse en términos de las funciones base que pertenecen a un átomo específico, como se muestra en la ecuación (3.21).

$$D = \begin{pmatrix} D^{AA} & D^{AB} & D^{AC} & \vdots \\ D^{AB} & D^{BB} & D^{BC} & \vdots \\ D^{AC} & D^{BC} & D^{CC} & \vdots \\ \dots & \dots & \dots & \ddots \end{pmatrix} \quad (3.21)$$

donde el bloque asociado al átomo X y Y se determinan mediante la sumatoria (3.22), la cual corre sobre el número de orbitales moleculares ocupados (OM oc.). Los coeficientes c_{ij}^X y c_{ij}^Y son los coeficientes para las funciones base χ_t^X y χ_u^Y de los átomos X y Y en el orbital j .

$$D_{tu}^{XY} = \sum_{j=1}^{\text{MO oc.}} c_{ij}^X c_{uj}^Y \quad (3.22)$$

Los NAO para el átomo X son las eigenfunciones que diagonalizan el bloque D^{XX} . Por lo general, los NAO no son ortogonales, y, por lo tanto, se debe realizar el respectivo proceso de ortogonalización. Una vez se realiza el proceso de ortogonalización, se realiza el análisis de Mulliken sobre las nuevas

bases, en cuyo caso no va a contener las contribuciones provenientes desde los elementos fuera de la diagonal de la matriz (3.21).

El NPA ha sido utilizado con éxito en este trabajo como un criterio para diferenciar entre mecanismos de reacción de transferencia formal de hidrógeno (capítulo 6).

3.4.3. Análisis de poblaciones de Hirshfeld.

El análisis de poblaciones de Hirshfeld utiliza las densidades electrónicas de los átomos para realizar la partición de la densidad electrónica molecular.^[132] La densidad *promolecular* es definida como la suma de densidades atómicas a la geometría molecular, ecuación (3.23).

$$\rho_{promolécula}(r) = \sum_A^{\text{átomo } M} \rho_A^{\text{densidad atómica}}(r) \quad (3.23)$$

Los valores $\rho_A^{\text{densidad atómica}}(r)$ se calculan con base en las densidades del estado basal de los átomos, promediadas esféricamente. La densidad electrónica molecular sobre cada punto del espacio, es particionada por factores de ponderación de acuerdo a las contribuciones promoleculares, ecuación (3.24).

$$w_A(r) = \frac{\rho_A^{\text{densidad atómica}}(r)}{\rho_{promolécula}(r)} \quad (3.24)$$

La densidad electrónica del átomo enlazado (a.e.), se define como:

$$\rho_A^{\text{a.e.}} = w_A(r) \rho_{molécula}(r) \quad (3.25)$$

donde $\rho_{molécula}(r)$ corresponde a la densidad electrónica molecular (ecuación 3.3).

El análisis de poblaciones de Hirshfeld ha sido utilizado en este trabajo para la determinación de las densidades espín, necesarias para la determinación de los diferentes mecanismos de reacción de transferencia formal de hidrógeno.

Ningún análisis de población es perfecto, porque cuando un electrón forma parte de un orbital molecular producto de la combinación lineal de orbitales atómicos, definir cuanto de él pertenece

a un átomo o a otro es necesariamente arbitrario. La densidad electrónica es un observable, pero a que átomo en una molécula pertenece, no lo es.

3.5. Teoría convencional de estado de transición: TST.

Una molécula estable corresponde a un mínimo sobre una superficie de energía potencial dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer.^[2] Una reacción química puede ser descrita como el movimiento de núcleos desde un mínimo a otro. Normalmente, los mínimos en la superficie de energía potencial se encuentran conectados por un estado de transición (*transition state*, TS).

Un TS es una configuración geométrica que divide la región de reactivos y productos en una superficie de energía potencial. Desde un punto de vista multidimensional, un TS corresponde a un punto de silla de primer orden, que se caracteriza por ser una estructura de máxima energía en la dirección de la coordenada de reacción y un mínimo a través de todas las otras coordenadas (3N-7 en coordenadas internas), figura 3.4.

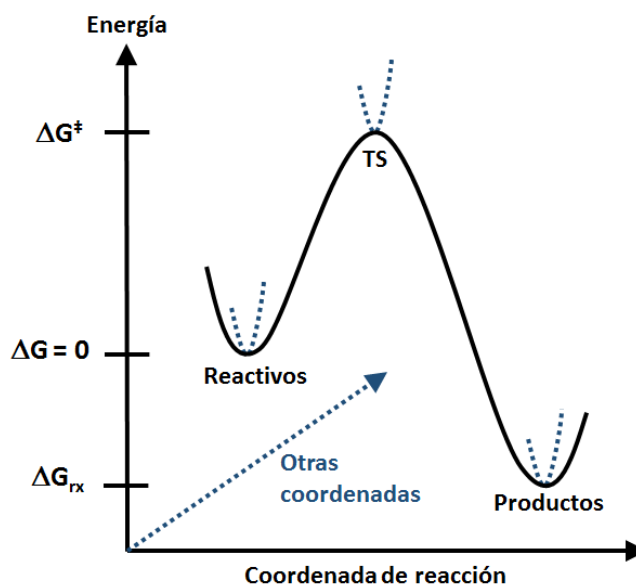


Figura 3.4. Ilustración esquemática de un camino de reacción.

Si se asume que, el TS se encuentra en equilibrio con los reactivos, la constante de velocidad macroscópica (k), puede expresarse como se muestra en la ecuación (3.26).^[133-135]

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (3.26)$$

donde ΔG^\ddagger es la energía libre de activación, que corresponde a la diferencia de energía libre de Gibbs entre reactivos y productos, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y h es la constante de Plank. La ecuación (3.26) se puede derivar con base en termodinámica estadística: i.e., reemplazando las ecuaciones del ensamble canónico (NVT) en las ecuaciones de velocidad de la reacción de pre-equilibrio $A + B \rightleftharpoons TS^\ddagger \rightarrow C + D$.^[12]

Con el fin de obtener un valor de k más realista, se pueden introducir términos adicionales en la ecuación (3.26).^[15] Uno de los términos que se recomienda introducir, es el coeficiente de transmisión (κ), el cual permite considerar el fenómeno mecano-cuántico de tunelaje, i.e., moléculas (o partículas) que no tienen suficiente energía para pasar sobre la barrera impuesta por el TS pueden tunelear a través de la barrera y aparecer en la región de productos.^[2] Otro de los términos que se puede incluir en la ecuación (3.26), es la degeneración del camino de reacción (σ), el cual considera los caminos de reacción equivalentes, consecuencia de la existencia de simetría rotacional.^[136] Incluyendo κ y σ en la TST, se obtiene la ecuación (3.27).

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (3.27)$$

La ecuación (3.26), corresponde la representación de la TST utilizada en este trabajo para el cálculo de las constantes de velocidad de reacción macroscópicas.

3.5.1. Degeneración del camino de reacción.

Pollak y Pechukas han demostrado que, la degeneración del camino de reacción σ es igual al número total de simetría rotacional de los reactivos ($\sigma_{rot,R}$) dividida entre la simetría total del TS ($\sigma_{rot,TS}$), como se muestra en la ecuación (3.28).^[136]

$$\sigma = \frac{\sigma_{rot,R}}{\sigma_{rot,TS}} \quad (3.28)$$

Para reacciones en las que participa más de un reactivo, $\sigma_{rot,R}$ es el producto de los valores de σ para cada reactivo, ecuación (3.29).

$$\sigma_{rot,R} = \prod_{i=1}^n \sigma_{rot,R^i} \quad (3.29)$$

Por lo tanto, para una reacción bimolecular entre los reactivos A y B, $\sigma_{rot,R}$ se debe calcular mediante la ecuación (3.30).

$$\sigma_{rot,R} = \sigma_{rot,A} \times \sigma_{rot,B} \quad (3.30)$$

Esta aproximación es muy sencilla y válida para muchos casos de estudio. Sin embargo, para los casos de estudio considerados en este trabajo, los reactivos y estados de transición calculados no presentan simetría rotacional, razón por la cual, el valor de $\sigma = 1$.

3.5.2. Efecto túnel: Potencial de asimétrico de Eckart.

La función de potencial de Eckart puede ser utilizada para estimar las correcciones mecano-cuánticas por efecto túnel.^[137,138] La función de energía potencial unidimensional de Eckart se presentan en la ecuación (3.31).

$$V = -\frac{Ay}{1-y} - \frac{By}{(1-y)^2} \quad (3.31)$$

donde y tiene la forma de la ecuación (3.32).

$$y = -\exp(2\pi x / L) \quad (3.32)$$

En la ecuación (3.32), x es la variable dimensión y L es una longitud característica de tunelaje. En la figura 3.5 se presenta el potencial de Eckart asimétrico, el cual es plano a valores de x iguales a $-\infty$ y $+\infty$, y los valores de ΔV_1 y ΔV_2 son máximos. El valor de F^* es la segunda derivada de la función de energía potencial en el máximo, i.e., la constante de fuerza para la frecuencia imaginaria a la geometría del TS.

Los parámetros A , B y L en las ecuaciones (3.31) y (3.32) se encuentran relacionados con los parámetros ΔV_1 , ΔV_2 y F^* , presentados en la figura 3.5, mediante las ecuaciones (3.33), (3.34) y (3.35).

$$A = \Delta V_1 + \Delta V_2 \quad (3.33)$$

$$B = [(\Delta V_1)^{1/2} + (\Delta V_2)^{1/2}]^2 \quad (3.34)$$

$$\frac{L}{2\pi} = \left(-\frac{2}{F^*}\right)^{1/2} \left[\frac{1}{(\Delta V_1)^{1/2}} + \frac{1}{(\Delta V_2)^{1/2}} \right]^{-1} \quad (3.35)$$

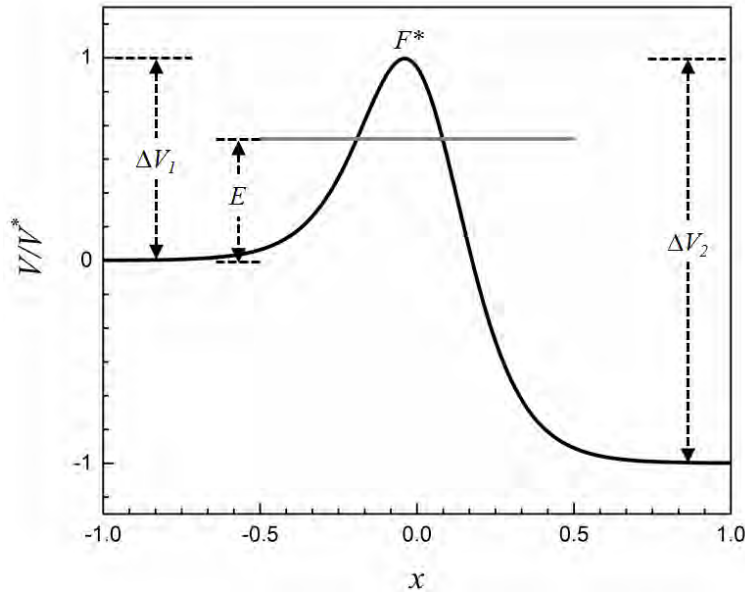


Figura 3.5. Función asimétrica de Eckart.

Una partícula de masa m y energía E aproximándose a la barrera, se caracteriza por los parámetros u^* , α_1 y α_2 :

$$u^* = \frac{h\nu^*}{k_B T} \quad (3.36)$$

$$\nu^* = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{-F^*}{m} \right)^{1/2} \quad (3.37)$$

$$\alpha_i = \frac{2\pi\Delta V_i}{h\nu^*}, i=1,2 \quad (3.38)$$

donde en la ecuación (3.36) y (3.38), h es la constante de Plank. El factor de corrección por efecto túnel, es definido como la razón de la constante de velocidad mecano cuántica entre la constante de velocidad clásica, i.e., calculada con TST, y se puede expresar como la integral de la ecuación (3.39).

$$\Gamma^* = \exp(\Delta V_1 / k_B T) \int_{E_0}^{\infty} \frac{\kappa(T, E) \exp(-E / k_B T)}{k_B T} dE \quad (3.39)$$

Brown propuso cambiar la variable E , por $\varepsilon = (E - \Delta V_1)/k_B T$, transformándose la integral (3.39) en la integral (3.40).^[138]

$$\Gamma^* = \int_{\varepsilon_0}^{\infty} \frac{\kappa(T, \varepsilon) \exp(-\varepsilon / k_B T)}{k_B T} d\varepsilon \quad (3.40)$$

donde $\varepsilon_0 = v_1 = -\Delta V_1/k_B T$ cuando $\Delta V_1 \leq \Delta V_2$, y $\varepsilon_0 = v_2 = -\Delta V_2/k_B T$ cuando $\Delta V_1 > \Delta V_2$. El coeficiente de transmisión $\kappa(T, \varepsilon)$ se puede expresar como

$$\kappa(T, \varepsilon) = \frac{\cosh 2\pi(a_1 + a_2) + \cosh 2\pi(a_1 - a_2)}{2\pi(a_1 + a_2) + \cosh 2\pi d} \quad (3.41)$$

Los parámetros de la ecuación (3.41) se calculan con base en las ecuaciones (3.42), (3.43) y (3.44).

$$2\pi a_i = \pi \left(\frac{\varepsilon - v_i}{c} \right)^{1/2}, i = 1, 2 \quad (3.42)$$

$$c = \frac{1}{8} \pi u^* (\alpha_1^{-1/2} + \alpha_2^{-1/2})^2 \quad (3.43)$$

$$2\pi d = (4\alpha_1 \alpha_2 - \pi^2)^{1/2} \quad (3.44)$$

En la ecuación (3.41), el término $\cosh 2\pi d$ se convierte en $\cos 2\pi |d|$ si d es imaginario.

El método de Eckart es una forma sencilla y eficiente de incluir la corrección por el efecto túnel en la TST, ya que únicamente requiere información acerca del camino de mínima energía, en particular, de los puntos estacionarios (reactivos, TS y productos). Los valores de $\kappa(T, E)$ obtenidos mediante el método de Eckart, proporcionan resultados más exactos que los obtenidos mediante otras metodologías que requieren un esfuerzo computacional mayor. Por esa razón, la metodología de Eckart ha sido utilizada en este trabajo para incluir las correcciones por el efecto túnel.

3.6. Estado estándar 1 M.

Los códigos computacionales disponibles para el desarrollo de estudios teóricos, proporcionan resultados en fase gas, i.e., estado estándar de 1 atm. Sin embargo, las constantes de velocidad asociadas a reacciones bimoleculares, tienen unidades de $M^{-1}s^{-1}$. Por lo tanto, es importante pasar los resultados del estado estándar de 1 atm a 1 M.^[15,139]

La constante de equilibrio de una reacción química (K), que ha alcanzado el equilibrio, puede expresarse como se muestra en la ecuación (3.45).

$$K = \prod_j a_j^{v_j} \quad (3.45)$$

donde v_j representa el número de moles. Para una reacción en función de presiones parciales, los valores de actividades, a_j , se reemplazan por p_j/p° , y para una reacción en función de concentraciones molares, se reemplazan por $[J]/c^\circ$. Los términos p° y c° , son la presión y concentración estándar, respectivamente, i.e, 1 atm y 1 M. Por lo tanto, al considerar un comportamiento ideal para los gases, p_j puede reemplazarse por $[J]RT$, y la constante de equilibrio en función de las presiones parciales (K_g) adquiere la forma de la ecuación (3.46):

$$K_g = \prod_j a_j^{v_j} = \prod_j \left(\frac{p_j}{p^\circ} \right)^{v_j} = \prod_j [J]^{v_j} \left(\frac{RT}{p^\circ} \right)^{v_j} = \prod_j [J]^{v_j} \times \prod_j \left(\frac{RT}{p^\circ} \right)^{v_j} \quad (3.46)$$

La constante de equilibrio en función de las concentraciones molares (K_c), adquiere la forma de la ecuación (3.47).

$$K_c = \prod_j \left(\frac{[J]}{c^\circ} \right)^{v_j} \quad (3.47)$$

Combinando las ecuaciones (3.46) y (3.47), se obtiene la ecuación (3.48), la cual muestra la relación entre K_g y K_c .

$$K_g = K_c \times \prod_j \left(\frac{c^\circ RT}{p^\circ} \right)^{v_j} \quad (3.48)$$

Ya que $\Delta v_j = \sum_j v_j$, que es igual a $v_j(\text{productos}) - v_j(\text{reactivos})$, se obtiene que:

$$K_g = K_c \times \left(\frac{c^\circ RT}{p^\circ} \right)^{\Delta v_j} = K_c \times \left(\frac{T}{12.03\text{K}} \right)^{\Delta v_j} \quad (3.49)$$

Considerando la relación entre las constantes de equilibrio y la energía libre de Gibbs (en unidades de kcal/mol), para una reacción con $\Delta\nu_j = -1$ (i.e, una reacción bimolecular en la que se forma un producto o un TS) y una temperatura de 298.15 K, se obtiene que:

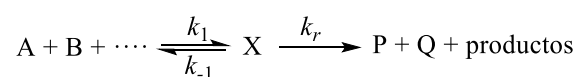
$$\Delta G^{1M} = \Delta G^{1atm} - 0.59 \ln(24.78) \quad (3.50)$$

Por lo tanto, al pasar del estado estándar de 1 atm al estado estándar 1 M, ocurre una disminución de 1.89 kcal/mol en ΔG^\ddagger o ΔG_{rx} para una reacción bimolecular a 298.15 K, si los reactivos y productos se encuentran conectados a través de un TS o se da origen a un solo producto de reacción, respectivamente. Una constante de velocidad calculada con los valores correspondientes al estado estándar de 1 atm, es 24.3 veces menor que la constante de velocidad considerando el estado estándar 1 M.

Para todas las reacciones bimoleculares que dan origen a un complejo de pre-reactivos o un TS, estudiadas en este trabajo, se ha incluido la corrección asociada a la transformación del estado estándar de 1 atm al estado estándar 1 M.

3.7. Efectos de la caja de solvente.

Benson ha determinado el efecto del solvente sobre reacciones que ocurren en fase gas, con base en el cual se ha propuesto el modelo de volumen libre (*the free volumen model*).^[15,140] Considere la reacción de pre-equilibrio



Por lo tanto, la velocidad de formación del producto P es igual a $dP/dt = k_r [X]$, donde [X] es la concentración de TS. De acuerdo a la aproximación realizada por Benson, la constante de velocidad de una reacción puede expresarse como

$$k = \nu K^\ddagger \quad (3.51)$$

donde ν es la frecuencia vibracional de X que lleva a la formación de los productos de reacción, y K^\ddagger es la constante de equilibrio asociada a la formación de X desde los reactivos, la cual es una función de la energía libre de activación, ΔG^\ddagger .

La razón entre las constantes de velocidad para una reacción que ocurre en disolución y una ocurriendo en fases gas es:

$$r = \frac{k_{rs}K_s^\ddagger}{k_{rg}K_g^\ddagger} \cong \frac{n10^{(2n-2)}}{e^{(n-1)}} \quad (3.52)$$

donde n se refiere al número de moles de reactivos, i.e., para una reacción bimolecular $n = 2$. De acuerdo a la ecuación (3.51), k_{rs} y k_{rg} son las frecuencias vibracionales del TS en disolución y fase gas, por lo que se puede esperar que la interacción con el solvente afecte esos términos ligeramente, i.e., $k_{rs} \cong k_{rg}$. Por lo tanto, la ecuación (3.52) se puede expresar como una razón entre constantes de equilibrio, ecuación (3.53).

$$\frac{K_s^\ddagger}{K_g^\ddagger} = \frac{e^{-\frac{\Delta G_s^\ddagger}{RT}}}{e^{-\frac{\Delta G_g^\ddagger}{RT}}} \cong \frac{n10^{(2n-2)}}{e^{(n-1)}} \quad (3.53)$$

donde ΔG_s^\ddagger y ΔG_g^\ddagger corresponde a las energías libres de activación en disolución y fase gas, respectivamente. Despejando el valor de ΔG_s^\ddagger en la ecuación (3.53), se obtiene que:

$$\Delta G_s^\ddagger = \Delta G_g^\ddagger - RT \left\{ \ln \left[n10^{(2n-2)} \right] - (n-1) \right\} \quad (3.54)$$

La ecuación (3.54) revela que, ΔG_s^\ddagger disminuye 2.55 kcal/mol en una reacción bimolecular a 298 K, con respecto a ΔG_g^\ddagger . El efecto del solvente, demuestra como la disminución de entropía asociada a una disminución de grados de libertad, por ejemplo, la formación de un TS en una reacción bimolecular, es menor en disolución comparada a la reacción en fase gas.

Al considerar tal corrección en los valores de ΔG^\ddagger , las constantes de velocidad calculadas en disolución con la TST, aumentan por un factor de ~ 74.0 . Por tal razón, la corrección asociada al modelo de volumen libre de Benson, ha sido utilizada en este trabajo para corregir las energías libres de activación de todos los TS calculados.

3.8. Reacciones de transferencia electrónica: Teoría de Marcus.

Las reacciones de transferencias electrónicas (TE) ocurren sin la participación de un TS, razón por la cual las ΔG^\ddagger se calculan con base en la teoría de Marcus, en la cual la energía de los reactivos y productos se aproximan por parábolas, figura 3.6.^[15,141-143] La energía de los reactivos corresponde

a una parábola con constante de fuerza a , con el mínimo a $x = 0$ y $\Delta G = 0$, ecuación 3.55. La energía de los productos se aproxima por otra parábola con constante de fuerza a (igual a la de los reactivos), con el mínimo a $x = 1$ y $\Delta G = \Delta G_{rx}$, ecuación 3.56. La coordenada de reacción x indica la cantidad de carga transferida, i.e., a $x = 0$ se ha transferido $0e^-$ carga y a $x = 1$ se ha transferido $1e^-$ carga. ΔG_{rx} es la energía libre de reacción, i.e., $G_P - G_R$.

$$G_R = ax^2 \quad (3.55)$$

$$G_P = a(x-1)^2 + \Delta G_{rx} \quad (3.56)$$

La energía de activación (ΔG^\ddagger) corresponde al punto de cruce en $x = x^\ddagger$ y se determina mediante la ecuación (3.57). La energía libre de activación ΔG^\ddagger se determinan mediante la ecuación (3.58).

$$x^\ddagger = \frac{1}{2} + \frac{\Delta G_{rx}}{2a} \quad (3.57)$$

$$\Delta G^\ddagger = \frac{a}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{rx}}{a} \right)^2 \quad (3.58)$$

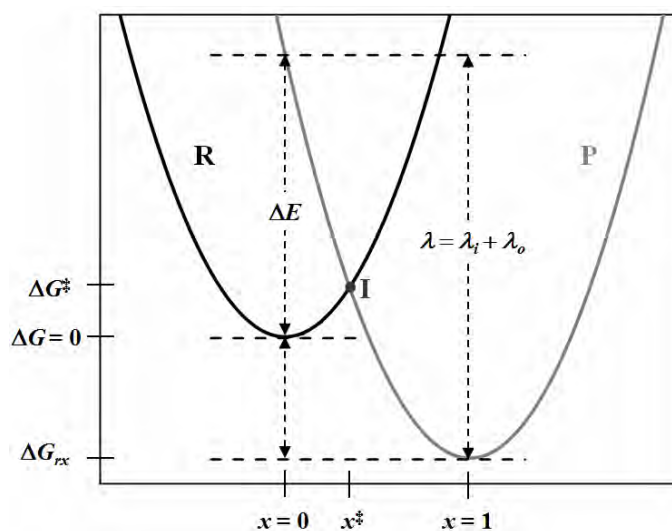


Figura 3.6. Representación esquemática de las superficies de Marcus para una reacción de transferencia electrónica. La superficie de reactivos (R) y productos (P), corresponden a las parábolas negra y gris, respectivamente. La intercepción (I) entre las superficies de R y P, corresponde a la energía libre de activación (ΔG^\ddagger)

La constante de fuerza a se denomina la energía de reorganización (λ), y corresponde a la suma de dos energías de reorganización: la energía de reorganización interna (λ_i) y la energía de reorganización del solvente (λ_o). El valor de λ_i corresponde a la variación de energía asociada a la relajación vibracional de los reactivos después de que ocurre la TE vertical (ΔE , figura 3.6), y se calcula con la ecuación (3.59). El valor de ΔE se calcula como la suma de la diferencia de energía electrónica a $x = 0$ entre la superficie de productos y de reactivos (i.e., la diferencia de energía electrónica (E) entre productos y reactivos con los productos estando a la geometría de los reactivos) y la energía de reorganización λ_o , ecuación (3.60). El valor de λ_o es la variación de energía asociada al reordenamiento de los momentos de dipolares de las moléculas de solvente (figura 3.7), consecuencia del proceso de TE, y se calcula con la ecuación (3.61)

$$\lambda_i = \Delta E - \Delta G_{rx} \quad (3.59)$$

$$\Delta E = [E_p(x=0) - E_R(x=0)] + \lambda_o \quad (3.60)$$

$$\lambda_o = (\Delta e)^2 \left(\frac{1}{\epsilon_\infty} - \frac{1}{\epsilon_0} \right) \left(\frac{1}{2r_D} - \frac{1}{2r_A} - \frac{1}{r_{DA}} \right) \quad (3.61)$$

En la ecuación 3.61, Δe es la carga transferida, ϵ_∞ y ϵ_0 son las constantes dieléctricas óptica y estática del solvente, r_D y r_A son los radios de donador (D) y aceptor (A), respectivamente, y r_{DA} es la separación centro a centro entre D y A.

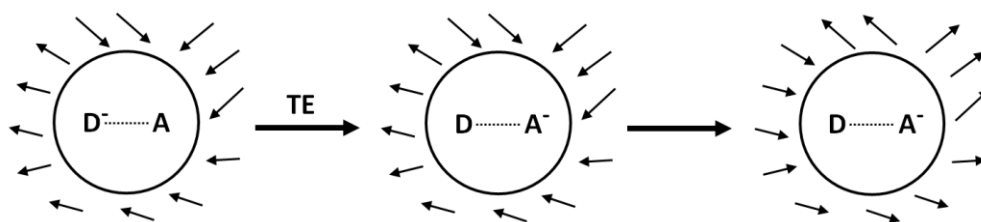


Figura 3.7. Representación esquemática del reordenamiento de los momentos dipolares de las moléculas de solvente (representados por flechas) durante el proceso de transferencia electrónica (TE). El reordenamiento de los momentos dipolares del solvente, ocurren después de la TE vertical.

Por lo tanto, la ecuación (3.58) puede expresarse como la ecuación 3.62, y corresponde a la ecuación utilizada en este trabajo para el cálculo de las energías libre de activación para reacciones de TE.

$$\Delta G^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{rx}}{\lambda} \right)^2 \quad (3.62)$$

3.9. Reacciones controladas por la difusión.

Cuando la probabilidad de que ocurra una reacción química entre una molécula A y una molécula B es cercana o igual a 1, la velocidad de reacción va estar limitada por la velocidad a la que se encuentran A y B en un determinado medio de solvatación. En tal caso, se dice que la reacción es controlada por la difusión, e.g., la recombinación de radicales libres.

Para determinar la velocidad de los encuentros entre A y B , se asume que A y B son moléculas esféricas en disolución.^[15,140] En el estado estacionario, se puede asumir que el gradiente esférico de moléculas B alrededor de una molécula A es constante, y, por lo tanto, el flujo de una molécula B a través de la solución es constante para cualquier superficie esférica S de radio r_S centrada en la molécula A . De acuerdo a la primera ley de Fick, se obtiene que

$$4\pi r_S^2 D_{AB} \left(\frac{\partial N_B}{\partial r} \right)_S = \text{constante} \quad (3.63)$$

Donde N_B representa la concentración de B , y D_{AB} es la suma de los coeficientes de difusión de A y B con respecto al solvente, i.e., $D_{AB} = D_{AS} + D_{BS}$. Por lo tanto, el gradiente estacionario es igual a

$$\left(\frac{\partial N_B}{\partial r} \right)_S = \frac{a}{r_S^2} \quad (3.64)$$

donde a es una constante, e integrando se obtiene que

$$N_B = -\frac{a}{r_S} + b \quad (3.65)$$

donde b es la constante de integración. Al asumir que $N_B = N_B^\circ$ a $r_S = \infty$ y $N_B = 0$ a $r_S = r_{AB}$, donde r_{AB} es la distancia de reacción entre A y B (i.e., si A y B se encuentran, la reacción ocurre y B desaparece), se obtiene que

$$a = N_B^\circ r_{AB} \quad (3.66)$$

Al reemplazar la ecuación (3.66) en las ecuaciones (3.64) y (3.63), se obtiene la velocidad estacionaria para un nuevo encuentro. Si el resultado de tal reemplazo, se divide por N_B° y se multiplica por el número de Avogadro (N_{av}), se obtiene la constante de velocidad para una reacción bimolecular irreversible controlada por la difusión:

$$k_D = 4\pi r_{AB} D_{AB} N_{av} \quad (3.67)$$

El coeficiente de difusión de las moléculas A y B , se calcula con base en la aproximación de Stokes-Einstein:^[144,145]

$$D_{AS \text{ o } BS} = \frac{k_B T}{6\pi\eta a_{A \text{ o } B}} \quad (3.68)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad del solvente, y a_A o a_B son los radios de los solutos A y B .

Finalmente, de acuerdo a la teoría de Collins-Kimball,^[146] se puede calcular la constante de velocidad aparente de una reacción controlada por la difusión de acuerdo a la ecuación (3.69).

$$k_{app} = \frac{k_D k^{TST}}{k_D + k^{TST}} \quad (3.69)$$

donde k^{TST} es la constante de velocidad calculada con base en la teoría del estado de transición.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Identificar, con base en la teoría de los funcionales de la densidad, qué radicales producto de la oxidación de residuos de aminoácidos en proteínas y ácidos grasos en las membranas celulares, son susceptibles de ser reparados por antioxidantes de relevancia biológica, identificar los mecanismos de reacción a través de los cuales ocurren los procesos de reparación y establecer los factores que los determinan.

4.2. Objetivos específicos.

- Calcular la viabilidad termodinámica de reacciones de reparación, en medio acuoso y lipídico, entre modelos de daño de residuos de triptófano, tirosina y leucina en proteínas y los antioxidantes de relevancia biológica ácido úrico, ácido ascórbico, glutatión y trolox.
- Calcular la viabilidad termodinámica de reacciones de transferencia formal de hidrógeno, en medio lipídico, entre un modelo de daño de lípidos de membranas celulares y diferentes antioxidantes lipofílicos.
- Calcular los estados de transición asociados a las reacciones de transferencia formal de hidrógeno viables termodinámicamente, para la reparación de los modelos de daño de aminoácidos y ácidos grasos, así como las superficies de energía potencial que conectan reactivos con productos.
- Realizar análisis de poblaciones de cargas y espín sobre los puntos de las superficies de energía potencial, con el fin de identificar si los mecanismos de reacción son secuenciales o concertados, y en el último caso, definir si el núcleo transferido corresponde a un átomo de hidrógeno o un protón.
- Una vez identificados los mecanismos de reacción, realizar el cálculo de constantes de velocidad con el fin de identificar la importancia relativa de los diferentes mecanismos de reparación de residuos de aminoácidos y ácidos grasos, y calcular las constantes totales de reparación.
- Identificar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de reactivos y productos que determinan los mecanismos de reparación identificados.

5. Metodología.

Determinar los mecanismos de reacción a través de los cuales una molécula exhibe algún tipo de actividad antioxidante, es una tarea compleja y de vital importancia para el diseño racional de antioxidantes sintéticos. A. Galano y J.R. Alvarez-Idaboy, diseñaron un protocolo basado en cálculos mecano-cuánticos para la determinación de la actividad antioxidante global (*quantum mechanics based test for overall free radical scavenging activity*, QM-ORSA).^[15] El protocolo fue validado por comparación con 16 resultados experimentales, para las cuales se determinó que la desviación más grande corresponde a una sobreestimación de 0.64 kcal/mol en una barrera de activación. La validación, así como un gran número de trabajos en los cuales se ha utilizado, han demostrado la gran utilidad de la metodología QM-ORSA para el desarrollo de estudios cinéticos de reacciones entre radicales libres y compuestos AO.

Algunos objetivos de la metodología QM-ORSA son:

- a. Identificar los principales caminos de reacción entre radicales libres y compuestos AO, en medio acuoso y lipídico.
- b. Evaluar la influencia del pH sobre la actividad antioxidante y la eficiencia de los diferentes caminos de reacción.
- c. Evaluar la influencia de la polaridad del medio sobre la eficiencia de la actividad antioxidante.
- d. Identificar los AO primarios más eficientes y sus características estructurales, en un intento por contribuir al diseño racional de fármacos enfocados a combatir el EO.

A continuación, se presentan los detalles computacionales de la metodología QM-ORSA, que corresponden al protocolo utilizado para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

5.1. Método computacional.

Los desarrolladores del protocolo QM-ORSA, recomiendan utilizar el funcional M05-2X en conjunto con el grupo de funciones base 6-31+G(d) a 6-311+G(d,p) y el modelo de solvatación SMD.^[15,126,129]

El funcional M05-2X fue diseñado para el cómputo de termoquímica, barreras de activación e interacciones no-covalentes.^[126] Existen diferentes ejemplos en la literatura, en los cuales el funcional M05-2X ha sido utilizado de forma exitosa para el desarrollo de estudios cinéticos teóricos y el cálculo de energías de reacción en la que participan moléculas de capa abierta.^{[15,80,81,100,124,147-}

Para describir de forma correcta las reacciones entre radicales libres y AO, es importante utilizar un conjunto de funciones base que incluyan, como mínimo, funciones de polarización y funciones difusas para átomos diferentes a hidrógeno.^[12,15] En particular, el uso de funciones difusas cobra importancia al momento de describir sistemas reactivos que implican la participación de compuestos aniónicos, característica que presenta un gran número de compuestos AO. Por lo tanto, la mínima base que se recomienda utilizar en estudios teóricos de actividad antioxidantes, es el conjunto 6-31+G(d).

Finalmente, ya que el EO se encuentra asociado a sistemas biológicos, el desarrollo de estudios teóricos en fase gas no es adecuado. Por tal razón, se recomienda considerar los efectos del solvente mediante la inclusión de un modelo de solvatación continuo. Los desarrolladores de la metodología QM-ORSA, recomiendan utilizar el modelo de solvatación continuo SMD, considerado un modelo de solvatación universal debido a la aplicabilidad para solutos neutros y cargados en cualquier solvente para el cual unos pocos descriptores son conocidos.

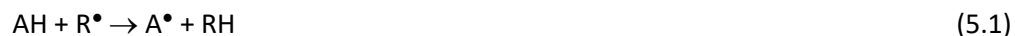
Es importante comentar que, en un *benchmark* (punto de referencia) realizado para 18 funcionales de la densidad y 19 reacciones entre radicales libres y moléculas de capa cerrada,^[124] en comparación con constantes de velocidad, se determinó que el error absoluto medio, asociado al funcional M05-2X y el método de solvatación SMD, es ~1.2 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación, resultado que demuestra la aplicabilidad de dicho funcional y modelo de solvatación en el desarrollo de estudios teóricos de actividad antioxidante. Debe mencionarse que, en el *benchmark*, debido a la gran cantidad de cálculos a realizar, no se hicieron estudios detallados de mecanismos de reacción, sino que se asumió un único mecanismo propuesto previamente. Obviamente si hay otro mecanismo implicado que influya sobre la velocidad de la reacción el resultado se ve afectado, por lo que el error puede estar sobrestimado.

En acuerdo con el protocolo QM-ORSA, los cálculos presentados en este trabajo se realizaron con el funcional M05-2X, el conjunto de funciones base 6-31+G(d,p) y el modelo de solvatación SMD. El conjunto de funciones base, adicional al uso de funciones de polarización *d* y difusas *s* y *p* sobre átomos pesados, incluyen funciones de polarización *p* para los átomos de hidrógeno.

5.2. Caminos de reacción.

Las reacciones entre radicales libres y AO, pueden ocurrir a través de tres principales caminos de reacción: FHT, SET y la formación de aducto radical (*radical adduct formation*, RAF).^[15]

Una reacción FHT, entre un antioxidante AH y un radical R•, se puede representar como



De acuerdo a lo discutido en la sección 2.5, las reacciones FHT pueden ocurrir a través de diferentes mecanismos de reacción. Sin embargo, independiente del mecanismo, el proceso neto corresponde a la transferencia de un H• entre reactivos.

Una reacción SET se puede representar como



donde el resultado neto es la transferencia de un e⁻ desde el compuesto AH al radical R•.

Finalmente, si el compuesto AH contiene enlaces dobles en su estructura, el radical libre puede adicionarse sobre las insaturaciones, dando origen a la formación de un aducto radical, reacción denominada como RAF.



En el estudio de la reparación química, únicamente las reacciones FHT y SET pueden llegar a ser importantes, y corresponden a las vías de reacción consideradas en este trabajo, i.e., una reacción RAF para un aminoácido oxidado puede considerarse una reacción de daño.

Una vez seleccionados los caminos de reacción que pueden participar en los procesos de reparación química, se debe calcular la viabilidad termodinámica. Aquellas reacciones con energías libres de reacción (ΔG_{rx}) negativas, son adecuadas para realizar el análisis cinético, y de esa forma acceder a la importancia relativa de cada vía de reacción. Las reacciones con valores de ΔG_{rx} positivos, corresponden a reacciones reversibles y, por lo tanto, no deben contribuir a los procesos de reparación química.

5.3. Determinación de constantes de velocidad.

Para la determinación de constantes de velocidad de reacción (k), se deben calcular las energías libres de activación (ΔG^\ddagger) de las reacciones viables termodinámicamente. Para las reacciones FHT, los valores de ΔG^\ddagger se obtienen mediante el cálculo de los estados de transición (TS) asociados a cada reacción, y para las reacciones SET, las energías de activación se calculan con base en la teoría de Marcus, ecuación 5.4.^[141-143]

$$\Delta G^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{rx}}{\lambda} \right)^2 \quad (5.4)$$

donde λ es la energía de reorganización y ΔG_{rx} es la energía libre de transferencia electrónica (sección 3.8).

Una vez calculadas los valores de ΔG^\ddagger , las k se pueden calcular mediante la teoría convencional del estado de transición (TST) utilizando la ecuación (5.5).^[15,133-135]

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (5.5)$$

donde σ es la degeneración del camino de reacción, κ la corrección por el efecto de tunelaje, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, h es la constante de Plank, R es la constante universal de los gases, y ΔG^\ddagger es la energía libre de activación (sección 3.5). El valor de σ se determinó con base en el método propuesto por Pollak y Pechukas (sección 3.5.1), y el factor de transmisión κ se calculó mediante la aproximación del túnel de curvatura cero para un potencial de Eckart (sección 3.5.2).

Todos los valores de ΔG^\ddagger asociados a reacciones que involucran la formación de un TS, se corrigieron para el estado estándar 1M (sección 3.6) y los efectos de la caja de solvente (sección 3.7). Finalmente, para las reacciones con velocidades controladas por la difusión ($k \geq 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), se realizó la corrección con base en la teoría de Collins-Kimball (sección 3.9).^[146]

$$k_{app} = \frac{k_D k^{TST}}{k_D + k^{TST}} \quad (5.6)$$

donde k^{TST} son las constantes de velocidad calculadas utilizando la ecuación (5.5), y k_D la constante de velocidad de Smoluchowski en el estado estacionario para una reacción bimolecular irreversible (sección 3.9).^[151]

5.4. Constantes de velocidad a diferentes valores de pH.

Muchos compuestos químicos pueden presentar diferentes grados de protonación a un valor de pH particular. Los valores de k para esos sistemas deben ser corregidos para la fracción de los reactivos

presentes al pH de interés.^[15] Por ejemplo, para la reacción entre un compuesto AH y un radical R•, el valor de k a un determinado valor de pH se calcula como se muestra en la ecuación (5.7).

$$k^{\text{pH}} = mf(\text{AH}) \times mf(\text{R}^\bullet) \times k^{\text{TST}} \quad (5.7)$$

donde $mf(\text{AH})$ y $mf(\text{R}^\bullet)$ son las fracciones molares de los reactivos al pH de interés, y k^{TST} es la constante de velocidad calculada utilizando la ecuación (5.5).

La fracción molar se calcula desde los valores de pK_a utilizando la ecuación (5.8).

$$mf(\text{X}^{n-}) = \frac{1}{1 + \sum_{j=1}^i \beta_j [\text{H}^+]^j} \quad (5.8)$$

donde

$$\beta_i = 10^{\sum_{j=1}^i \text{pK}_{a(n+1-j)}} \quad (5.9)$$

En la ecuación (5.8), X^{n-} representa los diferentes estados de protonación de un ácido poliprótico H_nX . Las ecuaciones (5.7)-(5.9), se utilizaron en este trabajo para calcular las fracciones molares de las especies en equilibrio ácido-base y realizar la corrección a los valores de pH considerados.

5.5. Constante total de velocidad de reacción.

Una vez se ha calculado las k de velocidad para todas las reacciones posibles, se debe realizar el cálculo de la constante total de reacción (k_{total}), la cual es igual a la suma de todos los valores de k corregidos para las fracciones molares de los reactivos a un pH determinado.^[15]

Por ejemplo, para la reacción entre un ácido poliprótico H_nX con el radical R^\bullet , donde el ácido se encuentra sometido al equilibrio ácido-base



y las vías de reacción posibles son FHT y SET, la k de velocidad asociado a las reacciones entre las fracciones del ácido H_nX y el radical R^\bullet , a un valor de pH determinado, son iguales a

$$\begin{aligned}
 k_{H_nX}^{pH} &= mf(H_nX) \times mf(R^\bullet) \times [k_{H_nX}^{FHT} + k_{H_nX}^{SET}] \\
 &\vdots \\
 k_{X^{n-}}^{pH} &= mf(X^{n-}) \times mf(R^\bullet) \times [k_{X^{n-}}^{FHT} + k_{X^{n-}}^{SET}]
 \end{aligned}
 \tag{5.11}$$

Por lo tanto, el valor de k_{total} es igual a la suma de todas las ecuaciones (5.11), es decir

$$k_{total}^{pH} = k_{H_nX}^{pH} + \dots + k_{X^{n-}}^{pH} \tag{5.12}$$

Finalmente, las constantes de velocidad calculadas de la forma que muestra en la ecuación (5.12), pueden compararse directamente con valores experimentales a un valor de pH determinado.

5.6. Análisis mecanístico de reacciones FHT.

El análisis mecanístico realizado en este trabajo,^[80,118,119] comprende una extensión de la metodología QM-ORSA. Para realizar el análisis mecanístico, es necesario realizar el cálculo de la coordenada intrínseca de reacción (*intrinsic reaction coordinate*, IRC) que conecta reactivos con productos.^[2] Una vez obtenida la IRC, se realiza un análisis de poblaciones naturales (sección 3.4.2)^[131] y densidades de espín de Hirshfeld (sección 3.4.3)^[132] sobre los puntos de la superficie de energía potencial. El resultado de los análisis de poblaciones, permiten determinar la naturaleza del núcleo transferido, i.e., si el núcleo transferido es un H[•] o un H⁺. Los modelos de referencia utilizados para asignar la naturaleza del núcleo transferido, son las reacciones de intercambio de hidrógeno entre el radical bencilo y tolueno (HAT) y el radical fenoxilo y fenol (PCET), modelos introducidos en el capítulo 2, sección 2.5.^[114]

Adicionalmente, el comportamiento de las cargas y espines para el donador y aceptor, permite identificar si la reacción es concertada o secuencial.^[80] En el caso de reacciones concertadas (HAT o PCET), se aprecia la inversión de cargas y espines entre el donador y aceptor (figura 2.2, sección 2.5). Y en el caso de reacciones secuenciales, las cargas y espines del donador y aceptor no experimentan el proceso de inversión característico de una reacción concertada.

Para el caso de reacciones secuenciales, el cálculo de los orbitales moleculares HOMO y SOMO a la geometría del TS, permite diferenciar entre las vías de reacción PEST y EPST (sección 2.5).^[80] En el caso de PEST, el orbital HOMO y SOMO permanece localizado sobre el donador y aceptor, respectivamente. Y para una reacción EPST, los orbitales HOMO y SOMO se encuentran localizados sobre el aceptor y donador en la geometría del TS, respetivamente.

El análisis mecanístico es de gran importancia, ya que determina la forma en que se debe calcular las constantes de velocidad. Una reacción concertada se puede estudiar utilizando directamente la ecuación (5.5). Sin embargo, en el caso de reacciones secuenciales, se debe considerar la constante de equilibrio asociada a la primera etapa de reacción, por ejemplo, la constante de equilibrio asociada a la formación de complejo de transferencia de protón para una reacción PEST o el complejo de transferencia electrónica en una reacción SPGET (esquema 2.6, sección 2.5).

6. Reparación de radicales libres de aminoácidos.

En este capítulo, se presentan los resultados del análisis de viabilidad termodinámica, mecanístico y cinético, para las reacciones de reparación de radicales de Trp, Tyr y Leu, por los antioxidantes H_nUr^q , H_nAsc^q , GSH_n^q y H_nTx^q . Para los aminoácidos Trp y Tyr, se presentan los resultados del estudio de las reacciones de reparación entre los radicales de aminoácido y el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Primero, se discuten algunas consideraciones previas al estudio de reparación, asociadas a las propiedades ácido-base de los sistemas de interés y sus consecuencias sobre la importancia relativa de las posibles reacciones de reparación (sección 6.1.1), la viabilidad termodinámica de las reacciones (6.1.2) y el análisis mecanístico (sección 6.1.3). Posteriormente, se presentan los resultados para cada sistema estudiado: viabilidad termodinámica, análisis mecanístico y análisis cinético. Para las reacciones de reparación de Leu, se presenta la viabilidad termodinámica y el análisis cinético para cada reacción (secciones 6.11-6.14), y al final del capítulo se presentan los resultados del análisis mecanístico con cada uno de los reparadores considerados (sección 6.15).

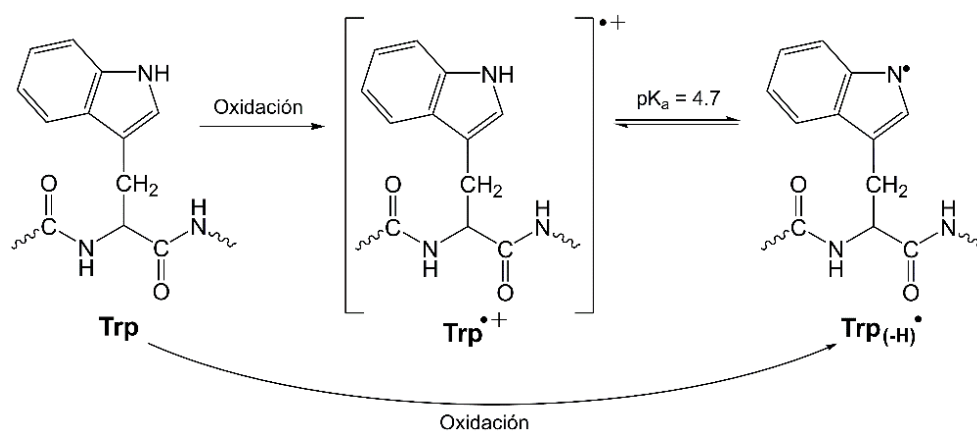
6.1. Consideraciones previas.

6.1.1. Equilibrio ácido base.

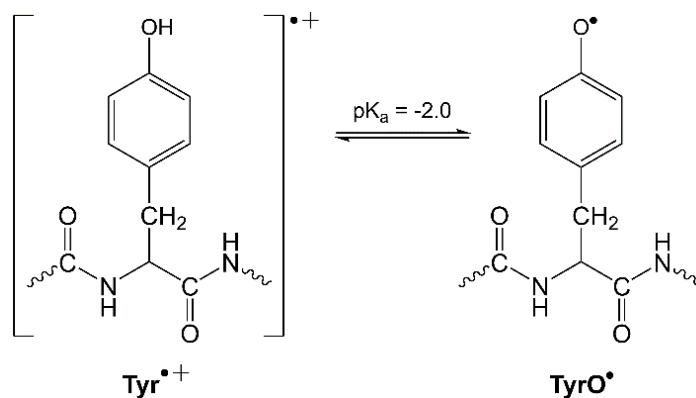
El daño sobre triptófano (Trp), mediado por radicales libres, da origen a dos productos de oxidación: el catión radical ($Trp^{+\bullet}$) y radical neutro ($Trp_{(-H)}^{\bullet}$) triptofanilo, esquema 6.1. El pK_a de $Trp^{+\bullet}$ es 4.7 y, a pH fisiológico,^[82-84] las fracciones molares de $Trp_{(-H)}^{\bullet}$ y $Trp^{+\bullet}$ son 0.998 y 0.002, respectivamente. Para los radicales libres de tirosina (Tyr) y leucina (Leu) a condiciones fisiológicas (pH = 7.4), las únicas especies presentes corresponden a las especies neutras. El catión radical de Tyr presenta un alto grado de acidez ($pK_a = -2$)^[89-93] y la fracción del radical neutro ($TyrO^{\bullet}$) a pH = 7.4 corresponde al ~100%, esquema 6.2. Para la Leu, el daño oxidativo ocurre de forma exclusiva a través de reacciones de transferencia de átomo de hidrógeno (*hydrogen atom transfer*, HAT) que dan origen a radicales centrados en átomos de carbono.^[100,103] La fracción de los diferentes radicales de Leu, es dependiente de la especie oxidante,^[100] y únicamente se encuentran en su estado neutro, esquema 6.3.

El ácido úrico (H_nUr^q), un importante antioxidante en sistemas biológicos, presenta dos valores de pK_a (5.8 y 10.8).^[152,153] Por lo tanto, en medio acuoso, tres especies se encuentran en equilibrio ácido-base: H_3Ur , H_2Ur^- y HUr^{2-} , esquema 6.4. A pH = 7.4, las fracciones de H_3Ur , H_2Ur^- y HUr^{2-} son 0.002, 0.975 y 3.46×10^{-4} , respectivamente. En la tabla 6.1 se muestra las energías libres (ΔG) de desprotonación calculadas para los grupos amino (NH) 1, 2, 3 y 4 (esquema 6.4) de la fracción neutra

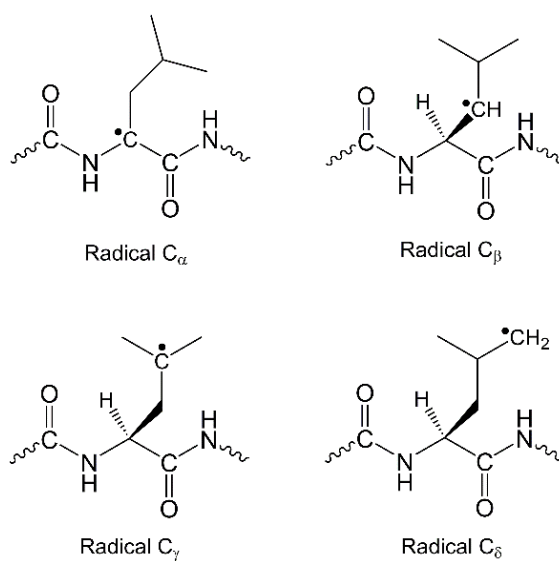
y mono-aniónica. El orden para la primera y segunda desprotonación reproduce las tendencias reportadas a partir de experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN).^[153]



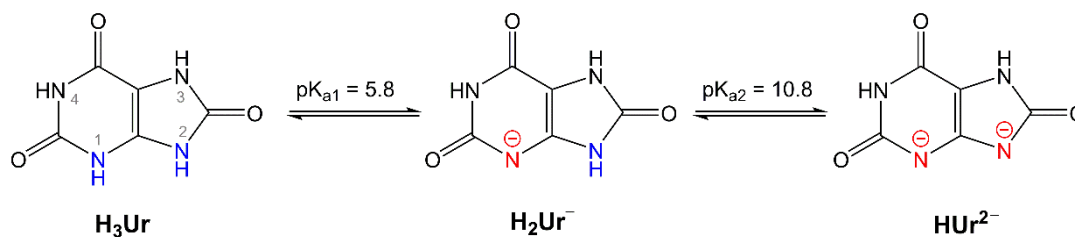
Esquema 6.1. Oxidación del triptófano y equilibrio ácido-base.



Esquema 6.2. Radicales de tirosina en equilibrio ácido-base.



Esquema 6.3. Radicales de leucina centrados en átomos de carbono.

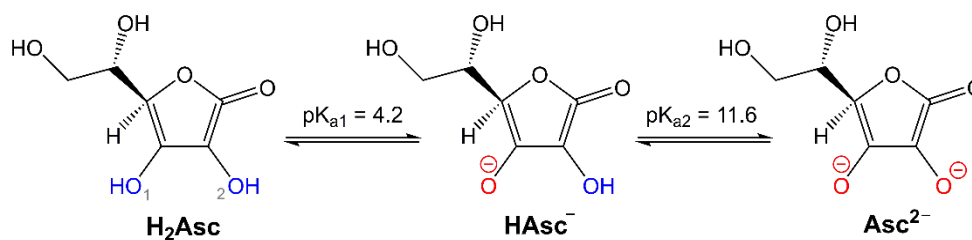


Esquema 6.4. Especies en equilibrio ácido-base para el ácido úrico.

Tabla 6.1. Energías libres de desprotonación (ΔG , kcal/mol) para el ácido úrico (H_3Ur y H_2Ur^-) y ácido ascórbico (H_2Asc) a pH = 7.4.

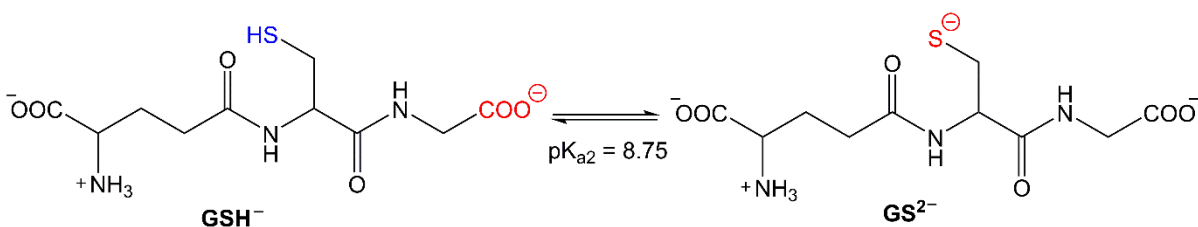
| Fracción | Sitio | $\Delta G^{\text{(pH=7.4)}}$ |
|-------------------------|-------|------------------------------|
| H_3Ur | 1 | -0.23 |
| | 2 | 1.16 |
| | 3 | 8.26 |
| | 4 | 7.65 |
| H_2Ur^- | 2 | 11.31 |
| | 3 | 14.67 |
| | 4 | 19.90 |
| H_2Asc | 1 | -0.31 |
| | 2 | 8.06 |

El ácido ascórbico (H_nAsc^a), otro importante antioxidante en sistemas biológicos, también presenta dos valores de pK_a (4.2 y 11.6),^[92,154,155] razón por la cual, en medio acuoso, puede dar origen a tres especies en equilibrio ácido-base: H_2Asc , HAsc^- y Asc^{2-} , esquema 6.5. En el caso de H_nAsc^a , a pH fisiológico, las fracciones de H_2Asc , HAsc^- y Asc^{2-} son 6.31×10^{-4} , 0.999 y 6.31×10^{-5} . En la tabla 6.1 se muestra las energías libres (ΔG) de desprotonación calculadas para los grupos hidroxilo (OH) 1 y 2 (esquema 6.5). Al igual que para el H_nUr , las tendencias calculadas reproducen aquellas reportadas en la literatura.^[155] El valor de energía libre para la segunda desprotonación no se presenta, ya que únicamente puede ocurrir en una posición, i.e., el grupo OH 2.



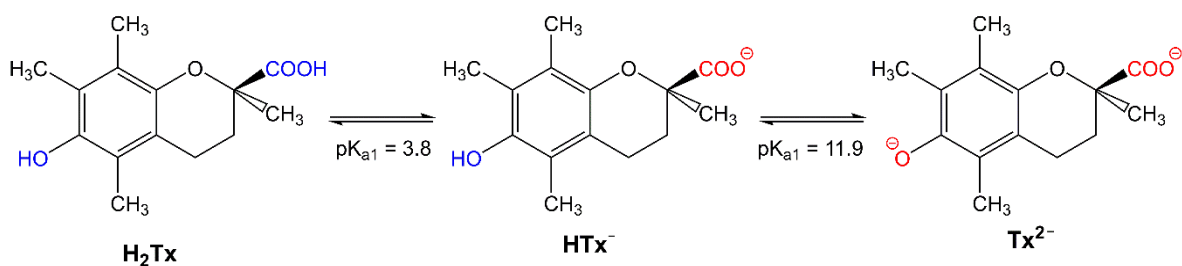
Esquema 6.5. Especies en equilibrio ácido-base para el ácido *L*-ascórbico.

El glutatión (GSH_n^q), un tripéptido antioxidante presente en el ser humano a concentraciones intracelulares relativamente altas ($\sim 0.1\text{-}10\text{ mM}$),^[156] presenta dos valores de pK_a : 3.59, asociado a un grupo carboxilo (resaltado con color rojo en el esquema 6.6), y 8.75, asociado al grupo tiol (SH) de la cisteína,^[16,157,158] esquema 6.6. A pH 7.4 las fracciones molares de las tres especies en equilibrio ácido-base son 1.48×10^{-4} (GSH_2), 0.957 (GSH^-) y 4.28×10^{-2} (GS^{2-}).



Esquema 6.6. Especies en equilibrio ácido-base para el glutatión.

El trolox (H_nTx^q) es un análogo del α -tocoferol soluble en agua y sus propiedades antioxidantes han sido estudiadas ampliamente.^[21,159-162] Se caracterizan por tener dos valores de pK_a , esquema 6.7. El primero, asociado al grupo carboxilo, $\text{pK}_{a1} = 3.89$, y el segundo, asociado al hidroxilo del anillo aromático, $\text{pK}_{a2} = 11.92$.^[163-165] A pH fisiológico, las fracciones molares de H_2Tx , HTx^- y Tx^{2-} son 3.09×10^{-4} , 0.9997 y 3.02×10^{-5} , respectivamente. Por lo tanto, es de esperarse que a pH = 7.4, cualquier actividad reparadora que pueda presentar el H_nTx^q , se encuentre asociada a la fracción mono-aniónica HTx^- . Sin embargo, a valores de pH inferiores al fisiológico, la fracción completamente protonada H_2Tx puede cobrar importancia.



Esquema 6.7. Especies en equilibrio ácido-base para el trolox.

El anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se encuentra en equilibrio ácido-base con el radical hidropéroxilo (HO_2^{\bullet}). i.e., $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HO}_2^{\bullet}$.^[49,166-168] El pK_a del radical HO_2^{\bullet} es igual a 4.8, y a pH fisiológico las fracciones de HO_2^{\bullet} y $\text{O}_2^{\bullet-}$ son 2.51×10^{-3} y 0.997, respectivamente. Por lo tanto, puede esperarse que, la reactividad a pH = 7.4 se encuentre relacionada al $\text{O}_2^{\bullet-}$, sin embargo, a pH ácidos, la fracción HO_2^{\bullet} debe cobrar importancia.

Las fracciones molares impuestas por los equilibrios ácido-base a un determinado pH, permiten, de forma preliminar, predecir que fracciones pueden llegar a ser importantes al momento de explicar las constantes de velocidad experimental (k_{exp}), i.e., al asumir que todas las reacciones pueden ocurrir a velocidades controladas por la difusión ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) son las fracciones molares de los reactivos las que asignan un límite superior para la velocidad de las reacciones de reparación.

Para la reacción de reparación de radicales de Trp por H_nUr^q , Domazou *et al.* han reportado una $k_{exp} = 1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[26,27] Por lo tanto, las constantes de velocidad aparente (k_{app} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para las reacciones de $\text{Trp}^{+\bullet}$ con H_3Ur , H_2Ur^- y HUr^{2-} tienen límites superiores (asumiendo que las reacciones son controladas por la difusión) del orden de $\sim 10^4$, $\sim 10^7$ y $\sim 10^3$, respectivamente. Y para las reacciones de $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ con H_3Ur , H_2Ur^- y HUr^{2-} , tienen límites superiores del orden de $\sim 10^7$, $\sim 10^9$ y $\sim 10^6$, respectivamente. Por lo tanto, existen cuatro reacciones que pueden llegar a ser importantes para explicar la k_{exp} reportada por Domazou *et al.*, i.e., $\text{Trp}^{+\bullet} + \text{H}_2\text{Ur}^-$, $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{H}_3\text{Ur}$, $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{H}_2\text{Ur}^-$ y $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{HUr}^{2-}$.

Aplicando el mismo razonamiento para la reacción de reparación de Tyr por H_nUr^q ($3.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en pepsina y $5.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en lisozima, Domazou *et al.*),^[26,27] las reacciones que pueden ayudar a explicar las k_{exp} son dos, $\text{TyrO}^\bullet + \text{H}_3\text{U}$ y $\text{TyrO}^\bullet + \text{H}_2\text{Ur}^-$, con límites superiores para las k_{app} del orden de $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. La reacción entre el radical TyrO^\bullet y el di-anión HUr^{2-} tiene un límite superior para la k_{app} del orden de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, tal reacción representa un caso de estudio interesante, razón por la cual se ha considerado en el análisis mecanístico y cinético.

Para la reacción de reparación de Trp y Tyr por H_nAsc^q , ($1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en pepsina, respectivamente)^[23,27] las reacciones que pueden ser importantes a pH fisiológico son tres, $\text{Trp}^{+\bullet} + \text{HAsc}^-$, $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{HAsc}^-$ y $\text{TyrO}^\bullet + \text{HAsc}^-$, con límites superiores del orden de $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la primera y $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para las últimas dos. Adicional a las dos reacciones propuestas como importantes para los radicales de Trp y Tyr, se han considerado las reacciones con la fracción H_2Asc debido a que tal fracción cobra importancia a valores de pH inferiores a 7.4, característica importante en sistemas biológicos.

Respecto a las k_{exp} de reparación de radicales de Trp y Tyr reportadas para el GSH_n^- ($1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente),^[22,24,25,27] es necesario considerar las dos fracciones de radicales Trp ($\text{Trp}^{+\bullet}$ y $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$), la fracción de radical neutro de Tyr (TyrO^\bullet) y las tres fracciones de GSH_n^- (GSH_2 , GSH^- y GS^{2-}), así como todas las combinaciones posibles entre los radicales de aminoácidos y las

dos fracciones del compuesto reparador, i.e., $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{GSH}_2$, $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{GSH}^-$, $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{GS}^{2-}$, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{GSH}_2$, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{GSH}^-$, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{GS}^{2-}$, $\text{TyrO}^{\bullet} + \text{GSH}^-$, y $\text{TyrO}^{\bullet} + \text{GS}^{2-}$. Sin importar que las k_{exp} sean relativamente bajas, estas reacciones comprenden un caso interesante de estudio en la determinación de los mecanismos de reparación de aminoácidos dañados en sistemas biológicos.

Existe evidencia experimental que demuestra la capacidad reparadora de radicales de Trp y Tyr del $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$, i.e., los valores de k_{exp} a $\text{pH} = 7$ son 3.9×10^7 y $3.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente.^[18,20] Por lo tanto, a pH fisiológico, las únicas reacciones que puede explicar esos valores de k_{exp} , son: $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{HTx}^-$ y $\text{TyrO}^{\bullet} + \text{HTx}^-$, con límites superiores para las constantes de velocidad del orden de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, como ya se comentó, la fracción H_2Tx incrementa a valores de pH ácidos, razón por la cual se han considerado sus reacciones con los radicales de Trp y Tyr, i.e., $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{H}_2\text{Tx}$ y $\text{TyrO}^{\bullet} + \text{H}_2\text{Tx}$.

La reacción del anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ con radicales de Trp y Tyr, es un caso de estudio irrelevante a nivel biológico. Santus *et al.*, reportaron una constante de velocidad igual a $2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción de reparación de radicales de Trp por el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ a $\text{pH} = 7$.^[169,170] Prutz *et al.* observaron la inhibición del proceso de dimerización de radicales fenoxilo por acción del anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, consecuencia de un proceso de reparación (no se reportó una constante de velocidad para el proceso).^[171] Hunter *et al.* reportaron resultados experimentales que soportan las observaciones realizadas por Prutz.^[112] Sin embargo, no existe ningún detalle mecanístico acerca de las reacciones entre los radicales de Trp y Tyr con los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet} , y, por lo tanto, han sido incluidas en el desarrollo de este trabajo. De acuerdo a las propiedades ácido-base para el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el HO_2^{\bullet} , a pH fisiológico, la fracción más importante corresponde al anión radical, sin embargo, a valores de pH inferiores, la fracción HO_2^{\bullet} cobra importancia. Por lo tanto, se han considerado todas las reacciones que podrían ocurrir entre los radicales de aminoácidos (Trp y Tyr) y los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet} , i.e., $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{HO}_2^{\bullet}$, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{HO}_2^{\bullet}$, $\text{TyrO}^{\bullet} + \text{O}_2^{\bullet-}$ y $\text{TyrO}^{\bullet} + \text{HO}_2^{\bullet}$.

Para las reacciones de reparación de Leu por $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$, $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$, GSH_n^{q} y $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$, no existen datos experimentales disponibles en la literatura. Por lo tanto, para esos sistemas se han considerado todas las combinaciones posibles, i.e., todos los radicales de Leu con las diferentes fracciones de los cuatro antioxidantes.

Finalmente, es importante notar que, en un medio de baja constante dieléctrica, como la membrana celular, las únicas fracciones presentes de los radicales de aminoácidos y especies reparadoras, corresponden a las fracciones neutras (e.g., $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y H_3Ur).

las fracciones completamente protonadas del H_nUr^q , H_nAsc^q y H_nTx^q pueden presentar algún tipo de actividad reparadora en un medio de baja constante dieléctrica. Por otro lado, es muy poco probable que el GSH_n^q desempeñe su papel como reparador en un medio con constante dieléctrica mucho menor que la del agua, i.e., la solubilidad en agua es ~ 6 órdenes de magnitud mayor que *n*-octanol. Por lo tanto, únicamente se ha considera las fracciones H_3Ur , H_2Asc y H_2Tx para el estudio de viabilidad termodinámica de las reacciones FHT en pentiletanoato, el cual se caracteriza por tener una constante dieléctrica $\epsilon = 4.73$. Debido a que las reacciones SET involucran la formación de especies iónicas, no han sido consideradas en pentiletanoato.

6.1.3. Análisis mecanístico de las reacciones de transferencia formal de átomo de hidrógeno (FHT).

El objetivo de realizar el análisis mecanístico de las reacciones FHT, es determinar si el H^+ y e^- que conforman el átomo H^\bullet , son transferidos de forma concertada o secuencial, i.e., en una o más etapas elementales de reacción y si son transferidos como una sola entidad o independientemente (esquema 2.5, capítulo 2).^[80,119] Las propiedades fisicoquímicas, como los equilibrios ácido-base y potenciales de óxido-reducción de reactivos y productos, sirven como criterio preliminar para predecir si es probable que una reacción ocurra de forma secuencial.^[178] Cuando los valores de pK_a de las especies reaccionando son similares, puede ocurrir un intercambio de H^+ , proceso que modifica los potenciales de óxido-reducción de los reactivos de partida, e incrementa la probabilidad de que ocurra una reacción SET. En tal caso, el mecanismo es denominado como transferencia secuencial protón-electrón (*proton-electron sequential transfer*, PEST).^[80,178,179] Por otro lado, si los potenciales de óxido-reducción lo permiten, se puede transferir un e^- en una primera etapa de reacción, proceso que modifica la acidez de los reactivos y puede facilitar el intercambio de un H^+ en una segunda etapa de reacción. Dicho proceso se denomina como transferencia secuencial electrón-protón (*electron-proton sequential transfer*, EPST).^[178,179] Argumentos similares pueden ser utilizado para anticipar si existe la probabilidad de que mecanismo secuencial de pérdida de protón-transferencia electrónica (*sequential proton loss-electron transfer*, SPLET) sea activo.^[120-123] En SPLET, la característica clave es el pK_a del antioxidante, ya que permite determinar si la desprotonación es viable a un determinado valor de pH. En tal caso, si la fracción de antioxidante desprotonado es apreciable, especie que generalmente es un mejor donador de electrones, la etapa SET puede ocurrir.

Finalmente, puede existir un mecanismo secuencial considerado la contraparte del mecanismo SPLET, el mecanismo secuencial de ganancia de protón-transferencia electrónica (*sequential proton gain-electron transfer*, SPGET). En el mecanismo SPGET una de los reactivos se protona desde el medio de solvatación, proceso que incrementa su afinidad electrónica y puede favorecer una etapa SET. En este caso, opuesto a SPLET, el proceso de protonación modula el potencial redox del sistema.

Para los mecanismos HAT y PCET, la energía libre de disociación homolítica (*bond dissociation free energies*, BDFE) de los enlaces D-H y A-H (donde D y A se refieren al donador y aceptor, respectivamente) puede utilizarse para predecir si la reacción es viable.^[178] Tal razonamiento puede realizarse porque los valores de BDFE se encuentran conectados directamente con las energías libres de reacción, que corresponden a la fuerza motriz de los procesos químicos. Sin embargo, es importante notar que, los valores de BDFE no suministran información que permita diferenciar entre los mecanismos HAT y PCET, ya que el estado inicial y final considerados en los cálculos de BDFE, no reflejan si el núcleo transferido corresponde a una sola partícula o partículas separadas, i.e. un H• o un H⁺ y un e⁻. Por otro lado, los valores de BDFE son útiles para establecer la estabilidad relativa de los productos formados desde diferentes posiciones reactivas en la especie donadora, o para comparar la capacidad de diferentes moléculas de participar en procesos FHT.

Para identificar de forma inequívoca el mecanismo de una reacción FHT, se debe realizar un análisis más complejo.^[80,118,119] Primero, es necesario calcular los estados de transición (*transition state*, TS) y las coordenadas intrínsecas de reacción (*intrinsic reaction coordinate*, IRC) que conectan reactivos con productos. Esto, para todas aquellas reacciones que mostraron ser viables termodinámicamente. Segundo, se debe analizar la evolución de cargas atómicas y densidades de espín (sobre el donador, aceptor y núcleo en transferencia) como una función del IRC. Tercero, los análisis basados en los TS e IRC, pueden ser utilizados para proponer las ecuaciones de velocidad correctas y calcular las constantes de velocidad de reacción. Finalmente, las constantes de velocidad se pueden utilizar para establecer la importancia relativa de los diferentes caminos de reacción a un pH determinado, y comparar directamente los datos teóricos con datos cinéticos experimentales. Esta metodología ha sido implementada de forma exitosa en este trabajo, y ha permitido identificar los mecanismos de reparación de radicales de Trp, Tyr y Leu por los antioxidantes H_nUr^q, H_nAsc^q, GSH_n^q y HnTx^q, así como por los radicales HOO• y O₂•⁻, y proponer por primera vez ejemplos de reacciones que ocurren vía PEST, EPST y SPGET.

6.2. Reparación de triptófano por el ácido úrico (H_nUr^q).

6.2.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y ácido úrico (H_nUr^q).

En la tabla 6.2 se presentan los valores de energía libre de reacción (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpía de reacción (ΔH_{rx} , kcal/mol) calculadas para la reparación de los radicales de Trp por el H_nUr^q en medio acuoso. Dos caminos de reacción han sido considerados en medio acuoso, FHT y SET. La viabilidad termodinámica se presenta, únicamente, para aquellas reacciones que se considera que pueden llegar a ser importantes (sección 6.1.1). Para las reacciones FHT, de acuerdo a la metodología QM-ORSA,^[15] se han considerado diferentes sitios de reacción (posiciones numeradas en el esquema 6.4).

Tabla 6.2. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Trp por H_nUr^q en medio acuoso.

| Reacción | Radical | Reparador | NH | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} | |
|----------------------|----------------------|-----------|------------|------------------|-----------------|--------|
| FHT | $Trp_{(-H)}^\bullet$ | H_3Ur | 1 | -5.39 | -5.68 | |
| | | | 2 | -5.11 | -5.26 | |
| | | | 3 | -4.44 | -4.73 | |
| | | | 4 | 6.78 | 6.54 | |
| | | H_2Ur^- | 2 | -6.30 | -6.48 | |
| | | | 3 | -11.25 | -11.50 | |
| | | | 4 | 1.53 | 1.47 | |
| | | | HUr^{2-} | 3 | -12.62 | -13.34 |
| | | | | 4 | -5.28 | -5.72 |
| | | | SET | $Trp^{\bullet+}$ | H_2Ur^- | ---- |
| $Trp_{(-H)}^\bullet$ | H_2Ur^- | ---- | | 17.22 | 16.98 | |
| | HUr^{2-} | ---- | | 3.79 | 3.22 | |

Los datos de viabilidad termodinámica presentados en la tabla 6.2 indican que, existen siete reacciones FHT que pueden ocurrir entre el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ y H_nUr^q : tres con H_3Ur (NH 1, 2 y 3), dos con H_2Ur^- (NH 2 y 3) y dos con HUr^{2-} (NH 3 y 4). Adicionalmente, al comparar los valores de ΔG_{rx} con los de ΔH_{rx} para las siete reacciones posibles, se observa que los procesos son ligeramente desfavorecidos por la entropía ($\Delta H_{rx} < \Delta G_{rx}$) y, por lo tanto, la entalpía es la fuerza motriz de la reacción. i.e., la fuerza del enlace N-H en el Trp es ~ 4.1 - 11.5 kcal/mol más fuerte en comparación a los enlaces N-H de las diferentes fracciones de H_nUr^q .

Con base en el análisis vibracional, se ha determinado que el efecto entrópico desfavorable se debe a un aumento de energía para algunos de los modos de vibración a bajas frecuencias de los productos de reacción, i.e., el valor $T \cdot \Delta S_{\text{vib}}$ para el proceso de reducción del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ es -0.22 kcal/mol, y para la oxidación de las fracciones de $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$, todos los valores son negativos, y se encuentran en el rango de -0.41 a -0.98 kcal/mol, dependiendo de la fracción reparadora. El radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ pierde aromaticidad con respecto al Trp reducido, la cual se recupera durante el proceso de reparación y resulta en un aumento de las fuerzas de enlace C-C del anillo de indol. Por otro lado, el $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ pierde tres grados de libertad vibracional al transferir un átomo de hidrógeno, sumado al proceso de deslocalización electrónica en el radical formado que resulta en un aumento de la rigidez del heterociclo.

La reacción SET entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y H_2Ur^- mostró ser exergónica, lo que confirma la importancia de considerar dicho camino de reacción en la interpretación de los estudios de reparación de radicales de Trp por $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$. Nótese que, para dicha reacción, el efecto entrópico negativo es menor ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = -0.06$ kcal/mol) en comparación a los observados en las reacciones FHT, i.e., la pérdida de los tres grados de libertad vibracional en el $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ contribuye más al efecto entrópico negativo de las reacciones FHT, en comparación a la recuperación de la aromaticidad el anillo de indol. Finalmente, las reacciones SET consideradas para el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ no son viables termodinámicamente y no deben ser importantes para explicar la actividad reparadora del $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ a pH fisiológico.

En la tabla 6.3 se presentan los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por H_3Ur en pentiletanoato. De forma similar a las reacciones en medio acuoso, tres grupos NH del H_3Ur pueden participar en el proceso de reparación (sitios 1, 2 y 3). Las reacciones en los sitios NH 1 y 2 son -2.09 y -2.63 kcal/mol más exergónicas en comparación al medio acuoso, y la posición NH 3 es 0.31 kcal/mol menos favorable.

Tabla 6.3. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacciones de reparación de $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por H_3Ur en pentiletanoato.

| Reparador | NH | ΔG_{rx} (kcal/mol) | ΔH_{rx} (kcal/mol) |
|-----------------------|----|-----------------------------------|-----------------------------------|
| H_3Ur | 1 | -7.48 | -8.45 |
| | 2 | -7.75 | -8.61 |
| | 3 | -4.13 | -5.17 |
| | 4 | 11.06 | 10.28 |

Otra diferencia notable, entre las reacciones de reparación en agua y pentiletanoato, es la variación de la posición más reactiva en el H₃Ur. En medio lipídico, la posición NH 2 es -0.27 kcal/mol más exergónica en comparación a la reacción con el sitio NH 1. En medio acuoso, la reacción con la posición NH 1 se ve favorecida por -0.28 kcal/mol con respecto a la reacción con la posición NH 2. El cambio en la posición más reactiva es consecuencia del momento dipolar de los radicales formados, la magnitud del momento dipolar para los radicales sobre las posiciones NH 1 y 2 son 3.74 y 2.88 D, respectivamente. El radical en la posición NH 3 tiene un momento dipolar de 8.75 D. Los efectos entrópicos observados en medio lipídico, al igual que en medio acuoso, son desfavorables, consecuencia de la variación en la entropía vibracional al pasar de reactivos a productos, y, por lo tanto, la entalpía corresponde a la fuerza motriz de las reacciones.

6.2.2. Mecanismos de reparación de triptófano por el ácido úrico (H_nUr^q).

De acuerdo a lo discutido en la sección 6.1.1, se deben considerar un mínimo de cuatro reacciones en un intento por explicar los datos cinéticos experimentales para la reparación de radicales de Trp por H_nUr^q: Trp_(-H)• + H₃Ur, Trp⁺• + H₂Ur⁻, Trp_(-H)• + H₂Ur⁻ y Trp_(-H)• + HU²⁻. Los resultados de los análisis mecanísticos, permitirán plantear de forma correcta las ecuaciones necesarias para calcular las constantes de velocidad, y establecer la importancia relativa de cada reacción. A continuación, se presentan los mecanismos de reacción propuestos para las cuatro reacciones seleccionadas con base en las propiedades ácido-base de los reactivos.

6.2.2.1. *Reparación de Trp por la fracción completamente protonada del ácido úrico (H₃Ur).*

Los valores de pK_a para el radical Trp_(-H)• (4.7)^[84] y la primera desprotonación del H_nUr^q (5.8)^[153] son cercanos, característica que pone en evidencia la posibilidad de que dichas especies participen en un proceso reversible de intercambio de H⁺. Las constantes de equilibrio (K_{eq}) calculadas para la reacción Trp_(-H)• + H₃Ur ⇌ [Trp⁺•...H₂Ur⁻], con los sitios NH 1, 2 y 3 del H₃Ur, son 4.62 × 10⁻¹, 5.08 × 10⁻³ y 7.62 × 10⁻⁶ M⁻¹ respectivamente. La tendencia para los valores de K_{eq}, son consecuencia de la acidez de cada uno de los sitios reactivos en el H₃Ur, y son coherentes con las rutas de desprotonación calculadas en este trabajo (tabla 6.1), así como con los datos de desprotonación del H_nUr^q determinados a partir de experimentos de resonancia magnética nuclear de ¹³C,^[153] i.e., la primera desprotonación de la fracción H₃Ur ocurre sobre el sitio NH 1. Es importante notar que, aunque la ruta de formación para el complejo [Trp⁺•...H₂Ur⁻] con el sitio NH 1 no es viable termodinámicamente, la ocurrencia de una segunda etapa elemental SET puede hacer irreversible

el proceso FHT. Esta suposición es razonable al considerar que la afinidad electrónica y capacidad donadora de electrones del $\text{Trp}^{\bullet+}$ y H_2Ur^- , respectivamente, aumentan significativamente en comparación con sus precursores, i.e., el potencial de reducción (E° vs NHE) de los radicales de Trp a pH = 3 (la fracción de $\text{Trp}^{\bullet+}$ es del 98%) y pH = 13 (la fracción de $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ es del 100%) son 0.94 y 0.56 V,^[180] respectivamente, y para el $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ a pH = 7 (la fracción de H_2Ur^- es del 94.1%) y pH = 13 (la fracción de HUr^{2-} es del 99.3%) son 0.47 y 0.26 V,^[152] respectivamente. Por lo tanto, es probable que la reacción entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y la fracción H_3Ur ocurra a través de un mecanismo PEST, lo cual ha sido confirmado mediante los análisis de poblaciones de cargas atómicas y densidades de espín como funciones del IRC.

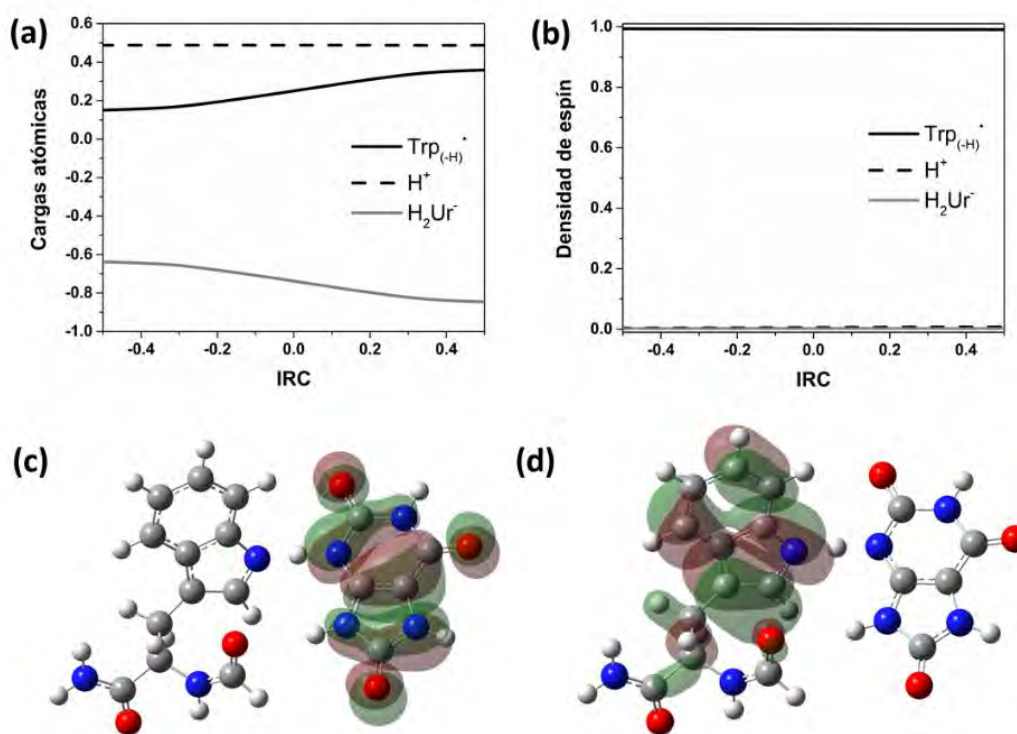


Figura 6.1. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y H_3Ur (NH 1). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

En la figura 6.1 se presenta la variación de cargas atómicas y densidad de espín sobre el donador (H_2Ur^-), aceptor ($\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$) y núcleo en transferencia (H^+), como una función del IRC. Las cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld son $\sim 0.5e$ y $0.004\text{-}0.007$, respectivamente, datos que demuestran que el núcleo transferido corresponde a un H^+ .^[80,118,119] Adicionalmente, se observa que

no ocurre inversión de la distribución de carga y densidad de espín entre el donador y aceptor, característica que puede ser asociada a un mecanismo de reacción secuencial,^[80] i.e., la transferencia del H⁺ ocurre en una primera etapa de reacción que puede favorecer la transferencia electrónica en una segunda etapa de reacción, mecanismo denominado PEST. En la figura 6.1, también se presentan los orbitales HOMO y SOMO para la geometría del TS. El hecho de que el orbital HOMO y SOMO se encuentren completamente localizados sobre el donador y aceptor, respectivamente, apoya la propuesta de que el TS se encuentra asociado a una superficie de energía potencial de transferencia de H⁺.^[80] El mismo comportamiento ha sido observado, para las reacciones del radical Trp_(-H)[•] con los sitios NH 2 y 3 de H₃Ur (apéndice A1).

La viabilidad termodinámica y cinética de la segunda etapa de reacción (SET) fue confirmada. Los parámetros para la transferencia electrónica han sido calculados considerando el complejo de transferencia de protón, i.e., [Trp^{•+}...H₂Ur⁻] → [Trp...H₂Ur[•]]. Las energías libres de reacción y activación, así como las energías de reorganización interna (λ_i) y del solvente (λ_o), para las etapas elementales SET se presentan en la tabla 6.5. Los resultados confirmaron que la segunda etapa de reacción puede ocurrir lo suficientemente rápido como para imponer la irreversibilidad a la reacción de reparación, i.e., una vez se alcanza la geometría del intermediario [Trp^{•+}...H₂Ur⁻] la transferencia electrónica ocurre de forma irreversible. Nótese que el proceso global corresponde a una reacción FHT y puede representarse mediante la siguiente secuencia de reacciones,

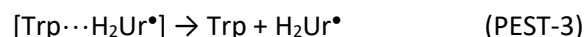
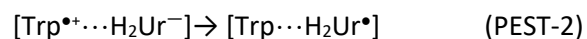
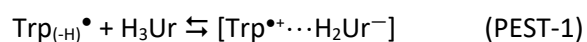


Tabla 6.4. Datos termodinámicos asociados a la reacción SET para el complejo de transferencia de protón, [Trp^{•+}...H₂Ur⁻] → [Trp...H₂Ur[•]]. Las unidades son kcal/mol.

| NH | $\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger}$ | λ_i | λ_o | $\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger}$ |
|----|------------------------------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| 1 | -5.11 | 18.16 | 8.98 | 4.47 |
| 2 | -3.25 | 15.13 | 6.80 | 3.98 |
| 3 | -7.31 | 17.99 | 7.98 | 3.35 |

En la figura 6.2 se presenta el perfil de reacción para la reparación de Trp_(-H)[•] por H₃Ur (sitio NH 1). Los parámetros ΔG_{SET} y λ , son los parámetros utilizados para calcular el valor de $\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger}$ con base en

la teoría de Marcus.^[141-143] La constante de equilibrio (K_{eq}) es necesaria para calcular la constante de velocidad de la reacción PEST al considerar el pre-equilibrio $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{H}_3\text{Ur} \rightleftharpoons [\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{H}_2\text{Ur}^-]$ (sección 6.2.3).^[181]

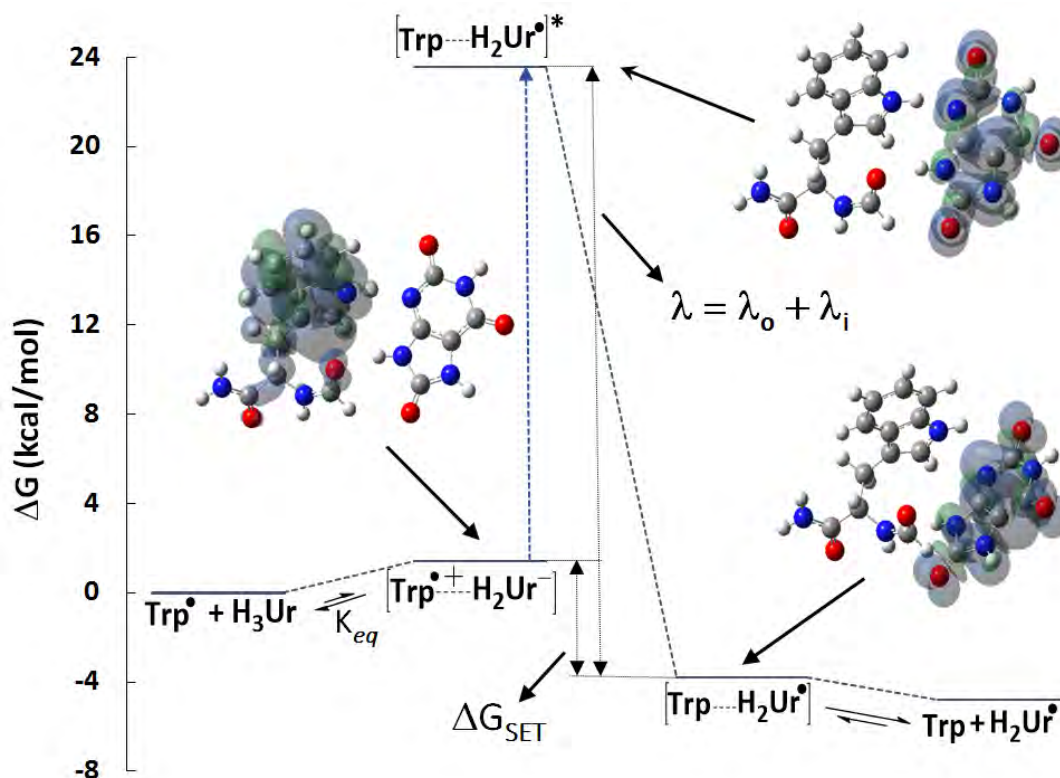


Figura 6.2. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ por H_3Ur (NH 1) a través del mecanismo de reacción PEST. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

El análisis mecanístico en medio lipídico, utilizando pentiletanoato como disolvente, indica que el mecanismo PEST es activo. Al igual que en medio acuoso, las reacciones son termodinámicamente favorables y presentan energías de activación bajas (sección 6.2.3), i.e., las reacciones ocurren rápidamente.

6.2.2.2. Reparación de Trp por la fracción mono-aniónica del ácido úrico (H_2Ur^-).

La fracción H_2Ur^- es la especie ácido-base dominante del ácido úrico a pH fisiológico (97.4%). La acidez de dicha especie es baja ($\text{p}K_a = 10.85$),^[153] razón por la cual no es probable que transfiera un H^+ al radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$. Si se asume que el potencial redox a $\text{pH} = 7$, corresponde al potencial de la fracción mayoritaria a dicho pH, se obtiene que la reacción SET entre $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y H_2Ur^- se encuentra favorecida termodinámicamente. ($E_{celda} = 0.05 \text{ V}$ y $\Delta G = -1.15 \text{ kcal/mol}$).^[152,180] Si dicho proceso SET

ocurre, el pK_a del H_2Ur^- cae de 10.85 a 3.1, y el pK_a del radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ aumenta de 4.7 a ~ 17 .^[182] En tal caso, el intercambio de H^+ entre los productos de la etapa SET se hace favorable y, por lo tanto, el sistema reaccionaría a través de un mecanismo EPST.

Por otro lado, es importante resaltar que, el valor de ΔG_{SET} teórico, presentado en la tabla.6.2 para la reacción SET entre H_2Ur^- y $Trp_{(-H)}^\bullet$, difiere significativamente (17.22 kcal/mol) del valor obtenido desde los potenciales redox disponibles en la literatura. Dicha diferencia se encuentra por encima de cualquier inexactitud que puede asociarse a los cálculos realizados en este trabajo e indica que, el uso de datos experimentales macroscópicos, con el fin de inferir propiedades de sistemas químicos sometidos a equilibrios ácido-base complejos, debe realizarse con cautela. Una posible explicación para tal discrepancia es que, los valores experimentales, a un determinado pH, provienen desde las contribuciones de todas las especies presentes en el medio de reacción y separar dichas contribuciones en reacciones independientes no es una tarea sencilla, si es que es posible. Por lo tanto, es altamente recomendable considerar todas las especies en equilibrio ácido-base, proceso que puede ser asistido de forma eficiente por el uso de herramientas computacionales. Los resultados obtenidos con base en el análisis mecanístico demostraron que, los mecanismos de reacción entre H_2Ur^- y $Trp_{(-H)}^\bullet$ no corresponden a ninguno que se podría esperar con base en los valores de pK_a y potenciales de óxido-reducción.

Los resultados de cargas NPA y densidades de espín a través de la coordenada de reacción para la reparación de $Trp_{(-H)}^\bullet$ por las posiciones NH 2 y 3 del H_2Ur^- , se presentan en las figuras 6.3 y 6.4. respectivamente. Dos mecanismos de reacción fueron identificados. La reacción de reparación con la posición NH 2 ocurre a través de un mecanismo secuencial PEST, y la reacción con la posición 3, ocurre de forma concertada a través de un mecanismo PCET.

Cuando la reacción involucra la posición con el sitio NH 2 del H_2Ur^- (figura 6.3), la primera etapa corresponde a la transferencia de un H^+ , i.e., las cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld son $\sim 0.5e$ and $0.004-0.006$, respectivamente. Este resultado es contradictorio con los valores de pK_a de las especies reaccionando y con el ΔG para el intercambio de H^+ (15.23 kcal/mol) i.e., $Trp_{(-H)}^\bullet + H_2Ur^- \rightleftharpoons [Trp^{\bullet+} \cdots HUr^2]$. Sin embargo, la segunda etapa de reacción, $[Trp^{\bullet+} \cdots HUr^{2-}] \rightarrow [Trp \cdots HUr^{\bullet-}]$, puede ocurrir rápidamente ($\Delta G^\ddagger_{SET} = 0.78$ kcal/mol) y es altamente exergónica ($\Delta G_{SET} = -21.16$ kcal/mol), suministrando la fuerza motriz necesaria para que la reacción PEST ocurra. Adicionalmente, se observa que los orbitales HOMO y SOMO, a la geometría del TS, se encuentran localizados sobre el donador y aceptor, confirmando que la primera etapa de reacción corresponde

a una transferencia de H^+ (figura 6.3) y, por lo tanto, que el sistema reacciona a través de un mecanismo PEST. Al igual que para la reacción entre $Trp_{(-H)}^\bullet$ y H_3Ur , la etapa de transferencia de H^+ modula las propiedades redox de los reactivos, lo que permite que la etapa SET trascorra, i.e., el incremento de la afinidad electrónica y capacidad donadora de electrones del aceptor y donador, respectivamente, son los factores claves que permiten que el mecanismo PEST ocurra. Sin embargo, debido a que la primera etapa de transferencia de H^+ es altamente endergónica, es de esperarse que la reacción entre $Trp_{(-H)}^\bullet$ y el sitio NH 2 del H_2Ur^- no aporte de forma significativa al proceso global de reparación de radicales de Trp por el H_nUr^a .

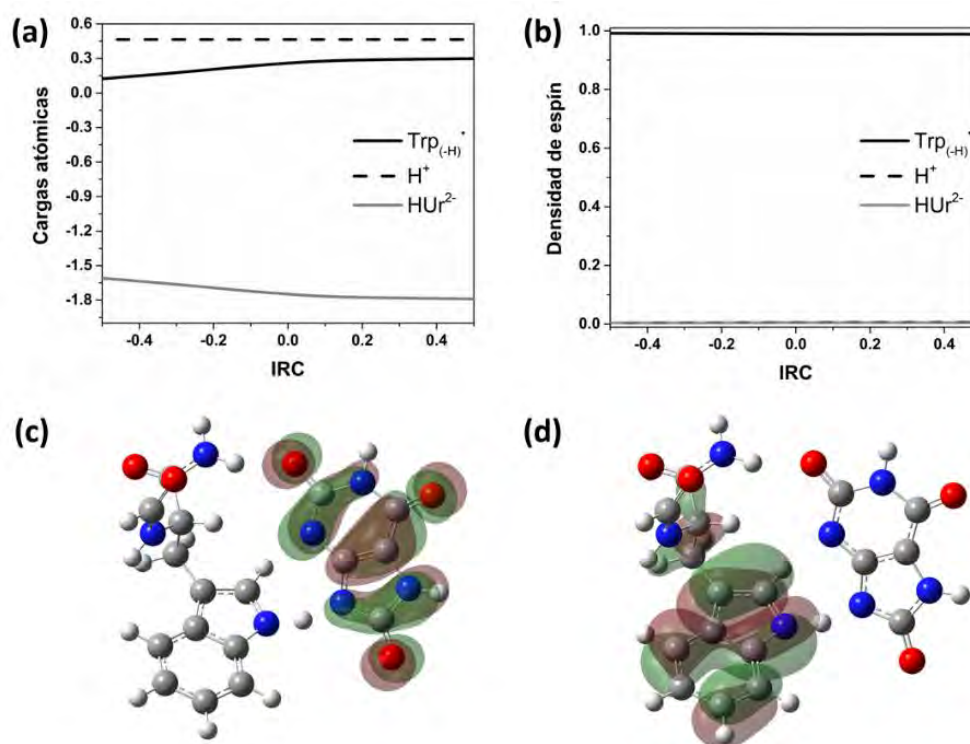


Figura 6.3. Reacción de reparación entre el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ y H_2Ur^- (NH 2). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

El camino de reacción con el sitio NH 3 de la fracción H_2Ur^- , es diferente de todos los caminos discutidos hasta el momento. La estructura del TS, que conecta reactivos con productos, presenta interacciones π - π *stacking*, característica que influye el mecanismo de reacción.^[117,119,183] Las cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.007-0.010, respectivamente (figura 6.4). Estos valores sugieren que el núcleo es transferido como un H^+ . Sin embargo, contrario a la reacción con el sitio NH 2, se observa una inversión de la densidad de espín

entre el aceptor y donador, lo que indica que el e^- es transferido simultáneamente con el H^+ , por lo tanto, la reacción ocurre a través de un mecanismo PCET. Para la región analizada del IRC, la densidad de espín cae desde 0.797 a 0.111 para el aceptor y aumenta de 0.196 a 0.880 para el donador, y en la geometría del TS son 0.284 y 0.706, respectivamente. La evolución de las densidades de espín, durante el transcurso de la reacción, demuestran que existe un proceso de deslocalización electrónica, característica asociada a un mecanismo PCET. La importancia de dicha deslocalización electrónica se evidencia en la estructura de los orbitales HOMO y SOMO. Por lo tanto, los resultados sugieren que, las interacciones $\pi-\pi$ *stacking* abren un canal de transferencia electrónica que permite que el H^+ y e^- (que conforman el H^\bullet) se transfieran en una sola etapa de reacción, pero como partículas separadas, por lo tanto, que la reparación ocurra a través de un mecanismo PCET.^[119] Nótese que la inversión de la densidad de espín ocurre antes de alcanzar la geometría del TS, en la región de reactivos. Esta característica se encuentra relacionada con la asincronía entre la transferencia del e^- y el H^+ , la cual se desvía en la dirección EPST. Una asincronía del 100% corresponde a una vía secuencial. i.e., PEST o EPST.

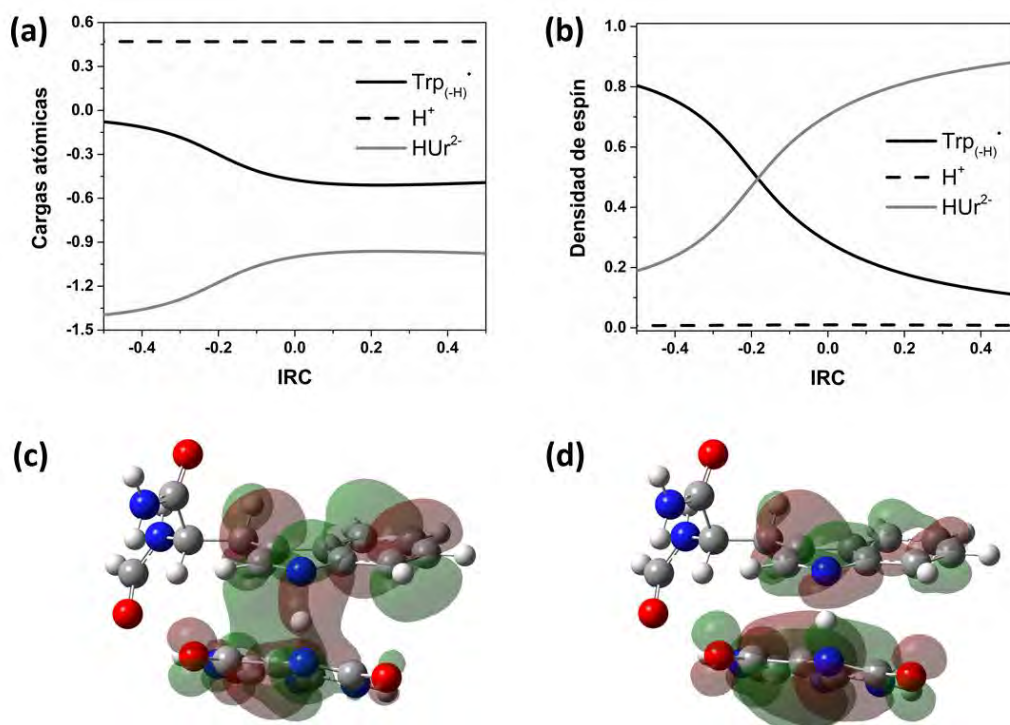


Figura 6.4. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y H_2Ur^- (NH 3). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

Adicional a los mecanismos PEST y PCET propuestos para la reacción entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y H_2Ur^- , se propone un tercer mecanismo de reacción secuencial, el cual es denominada como reacción secuencial ganancia de protón-transferencia electrónica (*Sequential Proton Gain-Electron Transfer*, SPGET). En la primera etapa del mecanismo SPGET, el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ captura un protón desde el medio de solvatación y da origen al catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$, proceso que aumenta la afinidad electrónica del radical neutro. En la segunda etapa de reacción, ocurre la transferencia electrónica desde H_2Ur^- hacia $\text{Trp}^{\bullet+}$. La secuencia de reacciones del mecanismo SPGET pueden representarse como

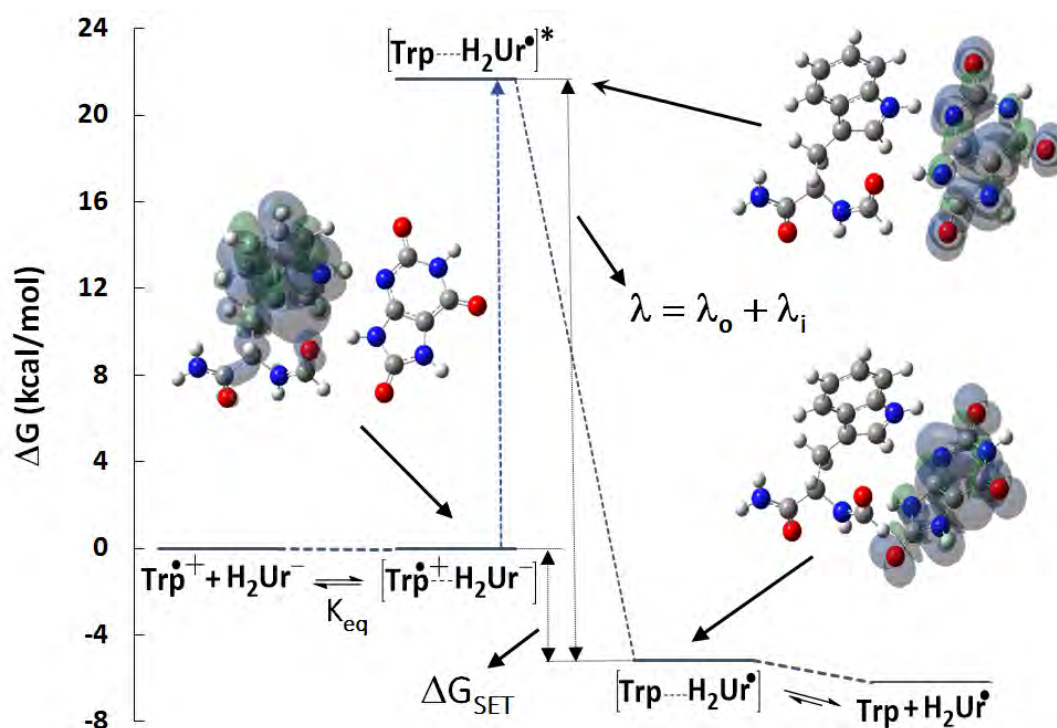
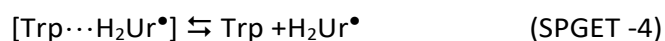
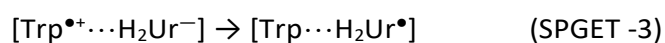
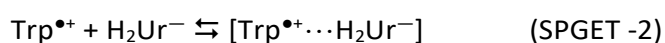
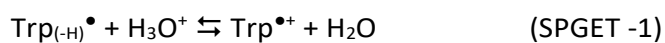


Figura 6.5. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por H_2Ur^- a través del mecanismo de reacción SPGET. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

El valor de la K_{eq} para la formación del complejo $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{H}_2\text{Ur}^-]$ es 1.04, valor que anticipa la importancia del mecanismo SPGET. El perfil de reacción para el mecanismo SPGET, se muestra en la

figura 6.5. Los parámetros K_{eq} , ΔG_{SET} y λ , son los parámetros necesarios para calcular la constante de velocidad del proceso. La principal diferencia entre la figura 6.2, para el mecanismo PEST, y la figura 6.5, para el mecanismo SPGET, son los reactivos de partida. Los reactivos de partida para el mecanismo PEST son el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ y el H_3Ur , y para SPGET son el catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ y el mono-anión H_2Ur^- . La primera etapa del mecanismo SPGET (i.e., la protonación $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ desde el medio) no se muestra en la figura 6.5.

Es importante notar que, como se mencionó en la sección 6.1.3, el mecanismo SPGET puede ser considerado como la contraparte del mecanismo SPLET.^[120-123] En SPGET, el intercambio de protón involucra el radical libre, mientras que en SPLET involucra el antioxidante. Por lo tanto, en SPLET la etapa de pérdida de protón modula el potencial redox de la especie antioxidante, mientras que en SPGET la ganancia de protón modula el potencial redox del radical libre, i.e., la desprotonación incrementa la capacidad donadora de electrones y la protonación incrementa la afinidad electrónica.

6.2.2.3. *Reparación de Trp por la fracción di-aniónica del ácido úrico (HUr^{2-}).*

De las tres especies en equilibrio ácido-base para el H_nUr^q , el di-anión HUr^{2-} se caracteriza por su alta capacidad de donar electrones (E_0' vs. NHE = 0.26 V a pH = 13).^[152] Por lo tanto, de acuerdo a los potenciales de óxido-reducción experimentales, la reacción SET entre el mono-anión HUr^{2-} y el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ (E_0' vs. NHE = 0.56 V a pH = 13)^[180] se encuentra termodinámicamente favorecida ($E_{celda} = 0.30$ V, $\Delta G = -6.92$ kcal/mol). Sin embargo, al igual que para la reacción entre el H_2Ur^- y $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$, el valor de ΔG_{SET} derivado con base en los potenciales de óxido-reducción experimentales para el HUr^{2-} y $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$, se encuentra en aparente desacuerdo con los valores teóricos ($\Delta G_{SET} = 3.79$ kcal/mol).

En la figura 6.6 se muestra el perfil IRC para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ por el HUr^{2-} . La superficie de energía potencial se caracteriza por tener dos regiones distintas, claramente definidas. La primera región, entre el punto A y B en la figura 6.6, corresponde a una etapa temprana de la reacción (coordinada de reacción desde -15.6 a -9.3) en la que los reactivos se encuentran relativamente aparte, la cual, con base en los análisis de poblaciones de cargas atómicas NPA y densidades de espín de Hirshfeld (figura 6.7), ha sido asociada a la transferencia electrónica entre reactivos. Entre el punto A y B, la densidad de espín para el radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ cae de 0.841 a 0.260, y aumenta de 0.156 a 0.732 para el reparador HUr^{2-} . Para el núcleo transferido, la carga y densidad

de espín son $\sim 0.5e$ y $0.003-0.008$, respectivamente, entre los puntos A y B de la coordenada de reacción.

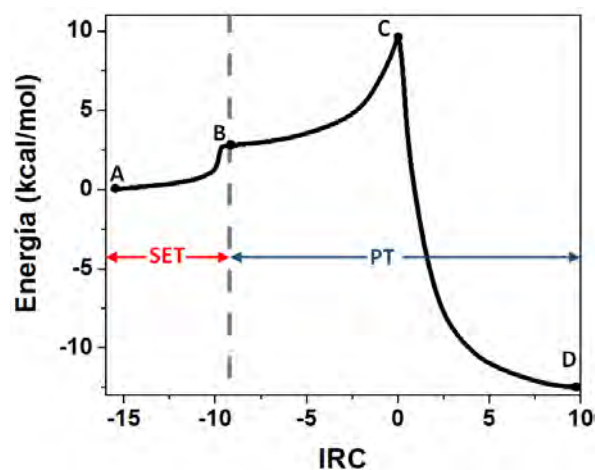


Figura 6.6. Coordenada intrínseca de reacción (IRC) para la reacción $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{HUr}^{2-}$ (NH 3).

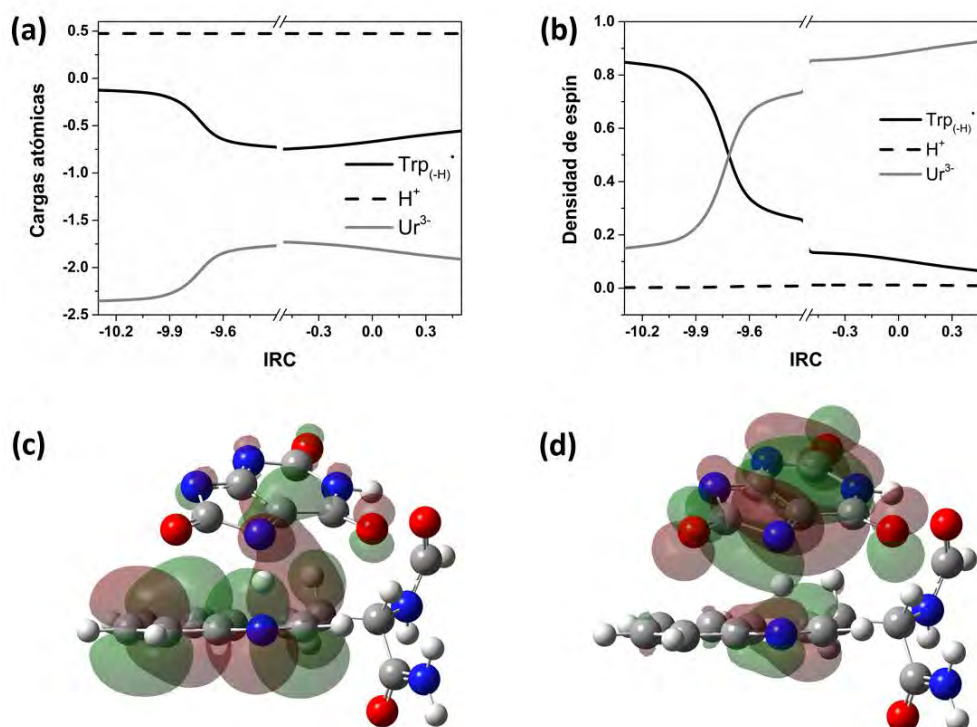


Figura 6.7. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HUr^{2-} (NH 3). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

La segunda región, entre el punto B y D, presenta el comportamiento característico de una reacción de transferencia de H^+ , i.e., la carga y densidad de espín del núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y $0.009-0.012$, respectivamente. Los orbitales HOMO y SOMO, a la geometría del TS (punto C en la figura 6.6), se encuentran deslocalizados sobre el donador y aceptor, sin embargo, la contribución a la densidad del orbital HOMO proviene principalmente desde el aceptor (89%), y para el orbital SOMO proviene desde el donador (91%), características esperadas con base en el comportamiento observado para las cargas atómicas y densidades de espín. Las características de la superficie de energía potencial para la reacción entre $Trp_{(-H)}^\bullet$ y H_2Ur^- (sitio NH 3), podrían asociarse con un proceso secuencial, figura 6.6. Sin embargo, tal conclusión es incorrecta, i.e., una reacción secuencial implica la formación de un intermediario al final de la primera etapa de reacción. La norma del gradiente (figura 6.8) para la coordenada de reacción, revela la existencia de un intermediario oculto después del punto B en la figura 6.6,^[184] característica que indica que la reacción ocurre en una etapa de reacción. La existencia de una región de transferencia de e^- y una región de transferencia de H^+ , indica que la reacción ocurre a través de un mecanismo PCET con un alto grado de asincronía en la dirección de EPST. Otra característica interesante del perfil de reacción, es la evolución de la distancia entre el átomo donador (N3 del HUr^{2-}) y aceptor (N en el anillo de indol del triptófano), figura 6.8. Adicional al pozo generado a la geometría del TS (distancia de ~ 2.5 Å), también se observa otro pozo (distancia de ~ 3.0 Å) que puede corresponder al intermediario oculto.

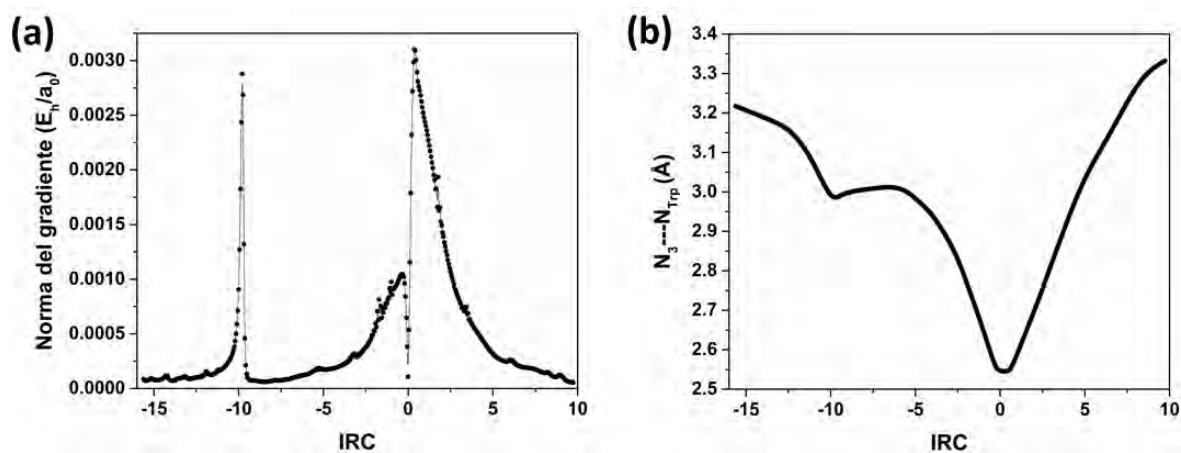


Figura 6.8. Características de la coordenada intrínseca de reacción (IRC) para la reacción entre el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ y HUr^{2-} (NH 3). Norma del gradiente (a) y separación entre los átomos N del reparador y radical libre (b) a través de la coordenada de reacción.

El desarrollo de la reacción con el sitio NH 4 del HUr^{2-} presenta un comportamiento convencional, i.e., sin la participación de intermediarios ocultos. Los valores de las cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.001 , respectivamente (figura 6.9). En la geometría del TS los orbitales HOMO y SOMO se encuentran localizados sobre el aceptor (93%) y donador (100%), respectivamente (figura 6.9). Dicho comportamiento indica que la reacción sucede en dos etapas. En la primera etapa ocurre un proceso de transferencia electrónica ($\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{HUr}^{2-} \rightarrow \text{Trp}_{(-\text{H})}^{-} + \text{HUr}^{\bullet-}$), y en la segunda etapa ocurre una transferencia de protón ($\text{Trp}_{(-\text{H})}^{-} + \text{HUr}^{\bullet-} \rightarrow \text{Trp} + \text{Ur}^{2-\bullet}$), i.e., el mecanismo de reacción es EPST.

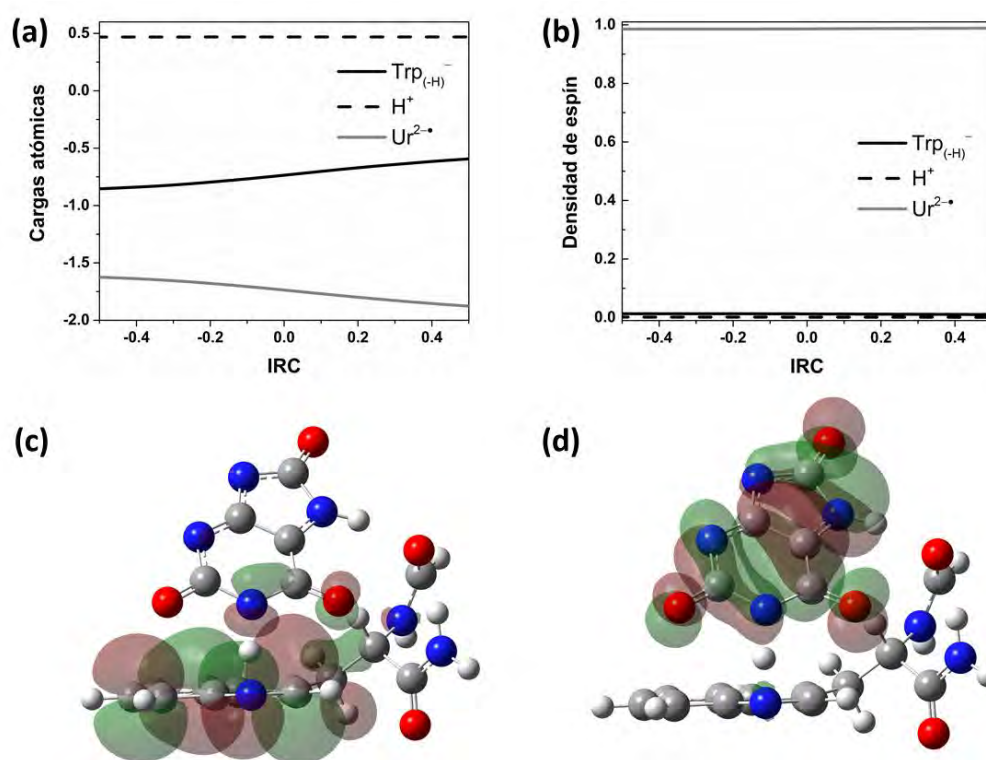


Figura 6.9. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HUr^{2-} (NH 4). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

6.2.3. Cinética de la reparación de triptófano por ácido úrico (H_nUr^n).

En la tabla 6.5 se presentan las constantes de velocidad, calculadas a pH fisiológico, para cada uno de los mecanismos de reacción encontrados. Para los mecanismos PEST y SPGET, la energía libre de activación de la etapa SET ha sido calculada con base en la teoría de Marcus,^[141-143] y la constante de velocidad, ha sido calculada considerando el pre-equilibrio asociado a la primera etapa de

reacción, i.e., $k_{\text{PEST/SPGET}} = K_{\text{eq}} \cdot k_{\text{SET}}$.^[181] En la tabla 6.6 se presentan los parámetros asociados a la etapa SET de los mecanismos PEST y SPGET. Todos los valores de ΔG_{SET} y $\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger}$ demostraron que las etapas elementales SET, para los mecanismos PEST y SPGET, son irreversibles y ocurren muy rápidamente. Por lo tanto, los valores de K_{eq} para la formación del complejo de reacción SET, así como la fracción molar de los reactivos, son los parámetros que determinarán la velocidad a la que ocurren las reacciones PEST y SPGET a un pH particular. Para el mecanismo EPST, el comportamiento observado indica que, la etapa SET ocurre sin barrera, y, por lo tanto, la energía de activación del proceso se calculó como la diferencia de energía libre entre el TS de transferencia de H^+ y los reactivos iniciales, i.e., $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HUr^{2-} .

Tabla 6.5. Constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y sus contribuciones a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reacción entre los radicales de Trp y H_nUr^q en medio acuoso.

| Radical | H_nUr^q | NH | Mecanismo ^[a] | ΔG^{\ddagger} ^[b] | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ | | 1 | PEST | 4.93 | 1.72×10^7 | 84.97 |
| | H_3Ur | 2 | PEST | 7.11 | 8.93×10^5 | 4.41 |
| | | 3 | PEST | 10.33 | 3.96×10^2 | 0.02 |
| | H_2Ur^- | 2 | PEST | 16.01 | 1.12×10^1 | 0.00 |
| | | 3 | PCET | 15.53 | 9.44×10^2 | 0.00 |
| | | HUr^{2-} | 3 | PCET | 10.87 | 3.11×10^1 |
| 4 | EPST | | 16.60 | 1.65×10^{-2} | 0.00 | |
| $\text{Trp}^{*\bullet}$ | H_2Ur^- | ----- | SPGET | 4.31 | 2.14×10^6 | 10.59 |
| | HUr^{2-} | ----- | SPGET | 2.80 | 9.51×10^2 | 0.00 |
| | | | | k_{total} | 2.02×10^7 | 100.00 |

^[a] PEST = Proton-Electron Sequential Transfer, PCET = Proton-Coupled Electron Transfer, EPST= Electron-Protom Sequential Transfer, SPGET = Sequential Proton Gain-Electron Transfer, ^[b] energía libre de activación (kcal/mol).

Con base en el análisis cinético, se determinó que los mecanismos PEST y SPGET contribuyen con el 89.40% y 10.59% a la constante de velocidad total (k_{total}), respectivamente. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de tales mecanismos de reacción en la reparación de radicales de Trp por el H_nUr^q , así como la necesidad de considerar las diferentes especies en equilibrio ácido-base en medio acuoso para la interpretación exitosa de datos cinéticos experimentales.

Tabla 6.6. Datos para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET para la reparación de Trp por H_nUr^q en medio acuoso, calculados a 298.15 K.

| Radical | H_nUr^q | NH ^[a] | Mecanismo | $K_{eq}^{[b]}$ | $\Delta G_{SET}^{[c]}$ | $\lambda_i^{[d]}$ | $\lambda_o^{[e]}$ | $\Delta G_{SET}^{\ddagger [f]}$ | k_{SET} |
|-----------------------|-----------|-------------------|-----------|------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Trp _(-H) • | H_3Ur | 1 | PEST | 0.46 | -5.22 | 18.16 | 8.98 | 4.47 | 3.29×10^9 |
| | | 2 | PEST | 5.08×10^{-3} | -3.25 | 15.13 | 6.80 | 3.98 | 7.53×10^9 |
| | | 3 | PEST | 7.62×10^{-6} | -7.31 | 17.99 | 7.98 | 3.35 | 2.17×10^{10} |
| Trp•+ | H_2Ur^- | 2 | PEST | 6.83×10^{-12} | -21.16 | 22.40 | 8.56 | 0.78 | 1.68×10^{12} |
| | | ----- | SPGET | 1.04 | -5.22 | 18.16 | 8.44 | 4.34 | 4.09×10^9 |
| | | ----- | SPGET | 0.03 | -21.16 | 22.40 | 7.73 | 0.67 | 2.01×10^{12} |

^[a] Sitio de reacción; ^[b] constantes de equilibrio (M^{-1}); ^[c] energías libres de reacción (kcal/mol); ^[d] energías de reorganización interna (kcal/mol); ^[e] energías de reorganización del solvente (kcal/mol); ^[f] energías libres de activación (kcal/mol); y ^[g] constantes de velocidad SET (s^{-1}).

Es importante notar que otros autores han asumido que, la constante de velocidad experimental es consecuencia de la reacción entre las especies mayoritarias a pH = 7.4, i.e., Trp_(-H)• y H_2Ur^- .^[26] Sin embargo, la constante de velocidad calculada para la reacción entre especies mayoritarias a pH fisiológico, es ~5 órdenes de magnitud menor con respecto a la constante de velocidad para el mecanismo PEST. Por otro lado, la magnitud de la k_{total} , calculada a pH fisiológico, es 1.9 veces mayor que la constante experimental ($k_{exp} = 1.09 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$),^[26,27] resultado que demuestra la robustez de la metodología utilizada en el estudio de la reparación de Trp por H_nUr^q . La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 0.36 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

Una característica importante de las reacciones PEST y SPGET es que, a pH inferiores al pH fisiológico, la velocidad aumenta de forma considerable, se observa un máximo a un valor de pH = 5.2, $k_{total} = 4.71 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ (para los endosomas tardíos y lisosomas el pH es 5.5 y 4.7, respectivamente)^[185], figura 6.10. El perfil de la k_{total} en función del pH, puede ser utilizada a nivel experimental con el fin de confirmar los mecanismos de reacción propuestos para la reparación del Trp por el H_nUr^q .

Para el medio lipídico, no se pudo calcular la reacción con la posición NH 3 del H_3Ur . Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en medio acuoso, es de esperarse que la reacción con tal posición no aporte de forma significativa al proceso de reparación global, i.e., la desprotonación de la posición NH 3 se encuentra desfavorecida en comparación a las posiciones NH 1 y 2 en el H_3Ur .

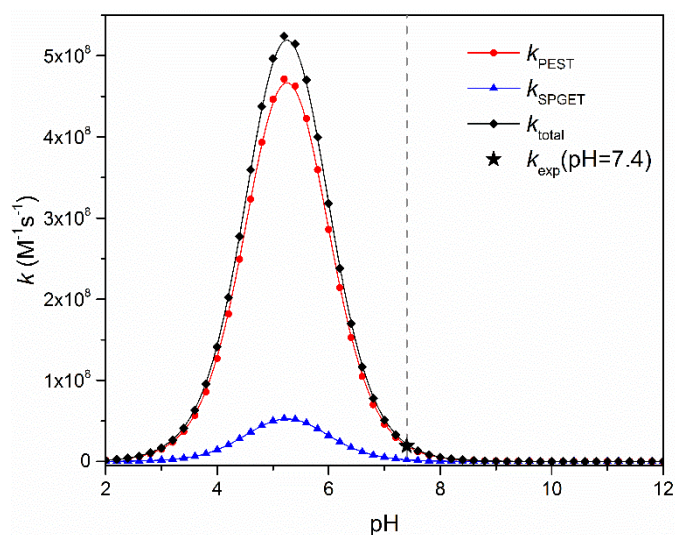


Figura 6.10. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PEST y SPGET, para la reparación de radicales de Trp por el H_nUr^q .

Los valores de las K_{eq} son menores en pentiletanoato (tabla 6.7) en comparación a los valores en medio acuoso. Una explicación posible es que, el carácter iónico de los complejos producto de la transferencia del H^+ son menos estables en un medio con constante dieléctrica baja. A su vez, los valores de ΔG_{SET} indican que la reacciones son más exergónicas, i.e., el proceso de estabilización de los complejos, es más importante en pentiletanoato. Las constantes de velocidad PEST, para la posición NH 1 y 2, son 4.98×10^8 y $5.96 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. Por lo tanto, la constante total se encuentra cerca del límite de control por difusión, $k_{total} = 5.57 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, y la reparación puede ocurrir eficientemente. Este último resultado es muy importante, porque las fracciones neutras de los reactivos, i.e., $Trp_{(-H)}^\bullet$ y H_3Ur , son las únicas especies estables de los radicales de Trp y H_nUr^q en un medio con constante dieléctrica baja. En la tabla 6.7, se presentan los parámetros asociados a la etapa SET del mecanismo PEST en pentiletanoato.

Tabla 6.7. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en el mecanismo PEST en pentiletanoato, calculados a 298.15 K.

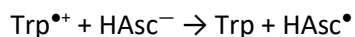
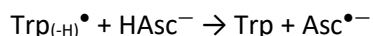
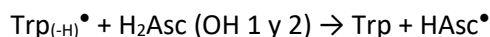
| NH ^[a] | K_{eq} ^[b] | ΔG_{SET} ^[c] | λ_i ^[d] | λ_o ^[e] | ΔG_{SET}^\ddagger ^[f] | k_{SET} |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| 1 | 2.45×10^{-3} | -13.76 | 25.34 | 3.78 | 2.03 | 2.03×10^{11} |
| 2 | 3.13×10^{-4} | -13.74 | 25.59 | 3.71 | 2.06 | 1.90×10^{11} |

^[a] Sitio de reacción del H_3Ur , ^[b] constantes de equilibrio (M^{-1}); ^[c] energías libres de reacción (kcal/mol); ^[d] energías de reorganización interna (kcal/mol); ^[e] energías de reorganización del solvente (kcal/mol); ^[f] energías libres de activación (kcal/mol); y ^[g] constantes de velocidad SET (s^{-1}).

6.3. Reparación de triptófano por el ácido ascórbico (H_nAsc^q).

6.3.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y ácido ascórbico (H_nAsc^q).

La tabla 6.8 contiene los datos de viabilidad termodinámica (ΔG_{rx} y ΔH_{rx} , kcal/mol) para las reacciones de reparación entre los radicales de Trp y el reparador H_nAsc . En este caso particular, a pH fisiológico, la única fracción importante de H_nAsc corresponde al mono-anión ($HAsc^-$). Sin embargo, como se mencionó en la sección 6.1.1, la fracción H_2Asc puede cobrar importancia a pH inferiores al pH fisiológico, razón por la cual se ha considerado en el estudio de reparación de radicales libres de aminoácidos. La termoquímica ha revelado la existencia de cuatro reacciones que pueden ser importantes, tres reacciones FHT y una reacción SET: las reacciones FHT entre $Trp_{(-H)}^\bullet$ y las dos fracciones de H_nAsc^q , y la reacción SET entre $Trp^{\bullet+}$ y $HAsc^-$,



La reacción SET entre el radical neutro y las fracciones consideradas para el H_nAsc , son altamente endergónicas, indicando que el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ presenta una afinidad electrónica baja, y, por lo tanto, es un mal aceptor de electrones.

Tabla 6.8. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Trp por el H_nAsc^q en medio acuoso.

| Reacción | Radical | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| FHT | $Trp_{(-H)}^\bullet$ | H_2Asc (OH 1) | -9.74 | -10.27 |
| | | H_2Asc (OH 2) | -8.24 | -8.71 |
| | | $HAsc^-$ | -19.71 | -20.46 |
| SET | $Trp^{\bullet+}$ | H_2Asc | 17.72 | 16.94 |
| | | $HAsc^-$ | -9.54 | -10.36 |
| | $Trp_{(-H)}^\bullet$ | H_2Asc | 40.92 | 40.13 |
| | | $HAsc^-$ | 13.65 | 12.83 |

Al igual que para las reacciones con H_nUr^q , la reacción FHT entre H_nAsc y $Trp_{(-H)}^\bullet$ se encuentran desfavorecidas entrópicamente, consecuencia del aumento en energía de algunas vibraciones a

bajas frecuencias de los productos de reacción. Para este sistema, los efectos entrópicos asociados a la recuperación de la aromaticidad en el Trp y pérdida de grados de libertad en el $H_n\text{Asc}^q$, también son válidos. Por lo tanto, la entalpía promueve las reacciones de reparación, i.e., el enlace N-H formado es 7.6 y 9.3 kcal/mol más fuertes que los enlaces O-H que se rompen en $H_2\text{Asc}$ (OH 1 y 2, respectivamente) y 19.7 kcal/mol más fuertes en comparación a los enlaces O-H en HAsc^- (OH 2).

En la tabla 6.9, se presenta la termoquímica para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ por $H_2\text{Asc}$ en pentiletanoato. Las reacciones demostraron ser más exergónicas en medio lipídico en comparación al medio acuoso. Específicamente, por -2.61 kcal/mol para el sitio OH 1, y por -1.50 kcal/mol el sitio OH 2. La posición más reactiva (OH 1) no cambia al pasar de medio acuoso a pentiletanoato, i.e., el momento dipolar de los radicales formados son 2.41 y 5.11 D para la posición OH 1 y 2, respectivamente. Al igual que todos los sistemas discutidos anteriormente, los efectos entrópicos son negativos, y, por consiguiente, la fuerza impulsora de la reacción es la variación de entalpía.

Tabla 6.9. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ por $H_2\text{Asc}$ en pentiletanoato.

| Reparador | OH | ΔG_{rx} (kcal/mol) | ΔH_{rx} (kcal/mol) |
|-----------------|----|----------------------------|----------------------------|
| $H_2\text{Asc}$ | 1 | -12.35 | -13.42 |
| | 2 | -9.74 | -10.68 |

6.3.2. Mecanismos de reparación de radicales de Trp por el ácido ascórbico ($H_n\text{Asc}^q$).

Para la reparación de radicales de Trp por el $H_n\text{Asc}^q$, se ha propuesto considerar dos reacciones con base en los equilibrios ácido-base (sección 6.1.1): $\text{Trp}^{+\bullet} + \text{HAsc}^-$ y $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet + \text{HAsc}^-$. Para el $H_n\text{Asc}^q$, la única fracción importante a pH fisiológico es la fracción mono-aniónica. Sin embargo, la fracción completamente protonada, $H_2\text{Asc}$, incrementa a valores de pH inferiores al pH fisiológico. Por lo tanto, se ha considerado en el análisis mecanístico debido a la posibilidad de que la reparación del radical $\text{Trp}_{(-H)}^\bullet$ ($pK_a = 4.7$), por dicha fracción, ocurra a través del mecanismo PEST, i.e., la primera desprotonación del $H_n\text{Asc}^q$ tiene un valor de $pK_a = 4.2$.^[155] Los potenciales de reducción de los productos del intercambio de H^+ , indican que la reacción SET se hace favorable para la segunda etapa de reacción del mecanismo PEST, i.e., los valores de $E^{o'}$ vs NHE para HAsc^- y $\text{Trp}^{+\bullet}$ son 0.30 V (pH = 7) y 0.94 V (pH = 3),^[92,180] respectivamente ($E_{celda} = 0.64$ V y $\Delta G = -14.76$ kcal/mol). Para este caso particular, el valor de ΔG_{SET} calculado (-9.54 kcal/mol, tabla 6.8), concuerda con la tendencia esperada desde los potenciales redox.

6.3.2.1. Reparación de Trp por la fracción completamente protonada del ácido ascórbico (H_2Asc).

Las reacciones SET entre los radicales de Trp ($Trp^{\bullet+}$ y $Trp_{(-H)}^{\bullet}$) y la fracción H_2Asc , son altamente endergónicas (los valores ΔG_{SET} son 17.72 y 40.92 kcal/mol, respectivamente). Sin embargo, la viabilidad termodinámica de las reacciones FHT, entre el radical $Trp_{(-H)}^{\bullet}$ y los dos grupos OH reactivos del H_2Asc (tabla 6.8), indica que los procesos de reparación son favorables.

Al considerar los valores de pK_a para el radical $Trp_{(-H)}^{\bullet}$ (4.7) y H_2Asc (4.2) se hace evidente la posibilidad de que las especies participen en una reacción de intercambio de H^+ . Nótese que, de acuerdo a los valores de ΔG para la desprotonación (-0.36 y 8.06 kcal/mol para el OH 1 y 2, respectivamente, tabla 6.1), es poco probable que el grupo OH 2 participe en un proceso de intercambio de H^+ , razón por la cual sólo fue posible localizar un TS para la reparación de $Trp_{(-H)}^{\bullet}$ por la posición OH 1 del H_2Asc .

El análisis sobre la evolución de cargas atómicas NPA y densidades de espín de Hirshfeld, a lo largo del IRC, se presenta en la figura 6.11. El comportamiento observado corresponde al esperado para un mecanismo PEST. La carga y densidad de espín sobre el núcleo en transferencia es $\sim 0.5e$ y 0.004-0.007, respectivamente. No se observa inversión de la densidad de espín entre los reactivos. Y, finalmente, los orbitales HOMO y SOMO se encuentran localizados sobre el donador y aceptor, respectivamente. El valor de K_{eq} para la reacción $Trp_{(-H)}^{\bullet} + H_2Asc \rightleftharpoons [Trp^{\bullet+} \cdots HAsc^-]$ con el sitio OH 1 es $33.6 M^{-1}$, valor que es congruente con la relación de pK_a entre las especies reaccionando. La energía de activación para la etapa SET, $[Trp^{\bullet+} \cdots HAsc^-] \rightarrow [Trp \cdots HAsc^{\bullet}]$, es baja ($\Delta G^{\ddagger}_{SET} = 4.35$ kcal/mol) y se encuentra termodinámicamente favorecida ($\Delta G_{SET} = -4.78$ kcal/mol). En la figura 6.12 se presenta el perfil de reacción PEST para la reparación del radical $Trp_{(-H)}^{\bullet}$ por el H_2Asc (sitio OH 1). Todos los parámetros en la figura 6.12 (K_{eq} , ΔG_{SET} y λ) son utilizados para calcular la constante de velocidad para la reacción PEST (sección 6.3.3).

Para este sistema, no fue posible realizar el análisis mecanístico en pentiletanoato, i.e., no fue posible localizar un TS. Por lo tanto, los resultados indican que la reparación de $Trp_{(-H)}^{\bullet}$ por la fracción H_2Asc , únicamente es importante en medio acuoso. Una posible razón para tal comportamiento, es la alta polaridad del TS y el complejo producto de la transferencia de H^+ , $[Trp^{\bullet+} \cdots HAsc^-]$, los cuales tienen carácter iónico. El momento dipolar del complejo $[Trp^{\bullet+} \cdots HAsc^-]$ en medio acuoso, es 23.81 D.

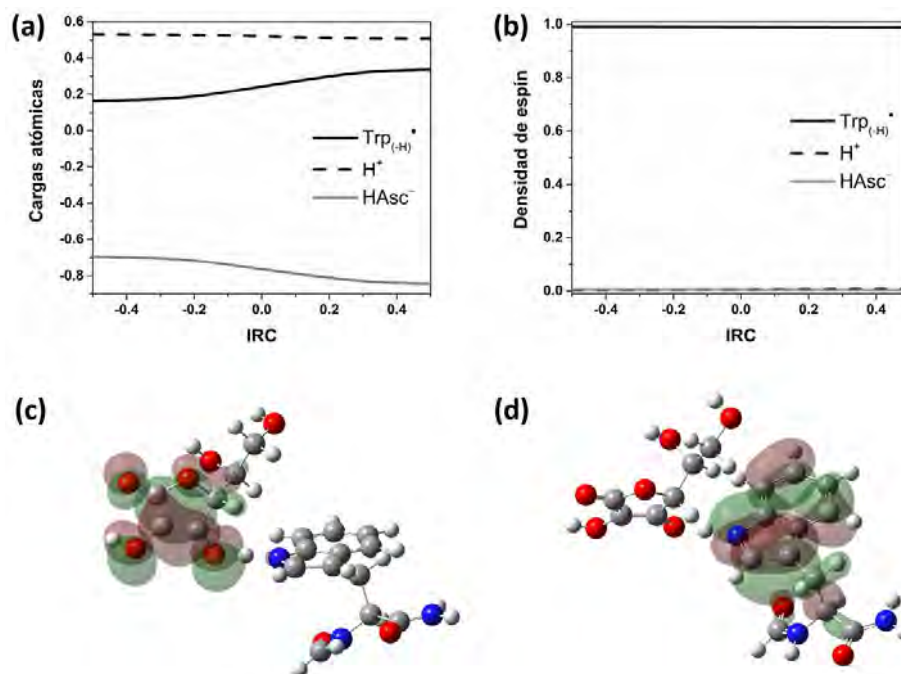


Figura 6.11. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y H_2Asc (OH 1). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

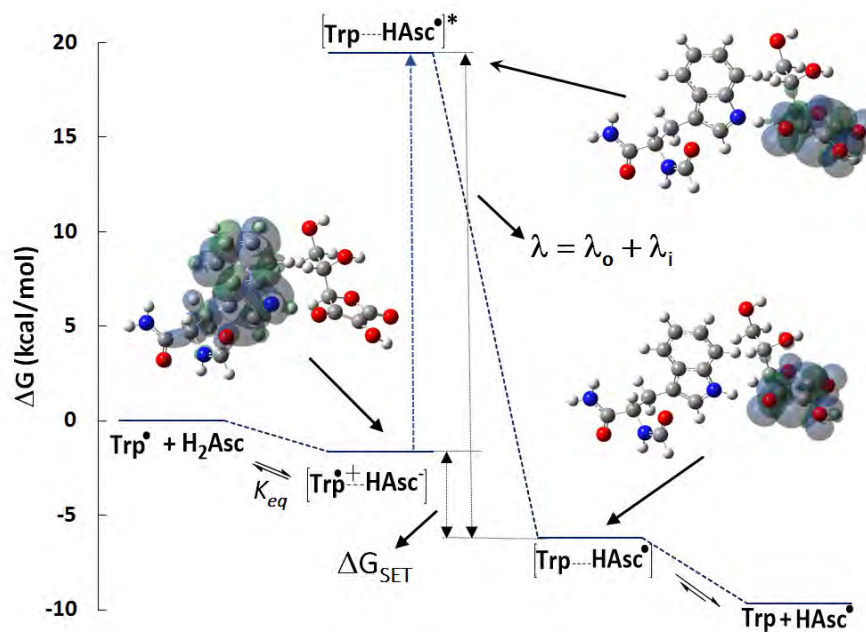


Figura 6.12. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ por H_2Asc (NH 1) a través del mecanismo de reacción PEST. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

6.3.2.2. Reparación de Trp por la fracción mono-aniónica del ácido ascórbico (HAsc^-).

La reacción SET entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y la fracción HAsc^- no es viable termodinámicamente (valor teórico de $\Delta G_{\text{SET}} = 13.65$ kcal/mol). Por otro lado, el valor de ΔG calculado para la reacción FHT, indica que el proceso de reparación es altamente exergónica ($\Delta G_{\text{FHT}} = -9.54$ kcal/mol). Para esta última reacción se localizó un TS con una energía de activación muy baja ($\Delta G^\ddagger = 2.87$ kcal/mol).

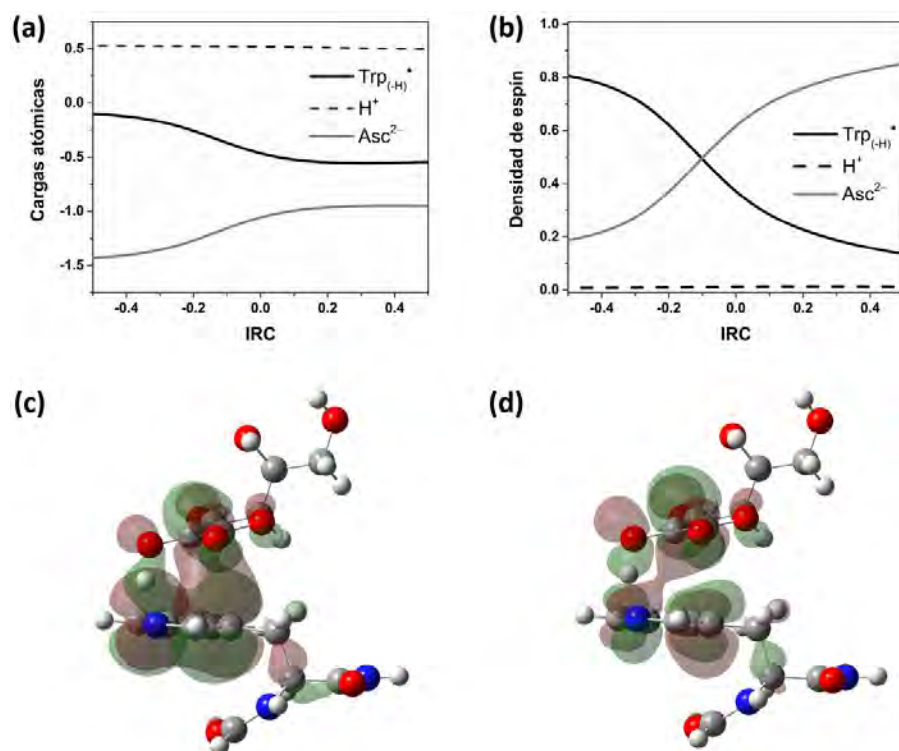


Figura 6.13. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y HAsc^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

En la figura 6.13, se presenta la evolución de las cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld como funciones del IRC. La carga y densidades de espín sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.007-0.014, respectivamente, i.e., el núcleo transferido corresponde a un H^+ . Los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados sobre la geometría del TS y revelan la existencia de interacciones π - π *stacking*, i.e., el e^- se transfiere de forma simultánea con el H^+ , pero como partículas separadas, a través de un mecanismo PCET. La reacción entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y la fracción HAsc^- , corresponde a otro ejemplo donde las interacciones π - π *stacking* abren un canal de transferencia electrónica, el cual permite que las dos partículas que conforman el H^\bullet (H^+ y e^-) se transfieran en una sola etapa

de reacción. La inversión de espín entre el donador y aceptor, ocurre antes de la geometría del TS, característica que refleja la asincronía en la dirección de EPST.

La reacción SET entre el catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ y el mono-anión HAsc^- presenta un valor de ΔG_{SET} favorable, -9.54 kcal/mol. Por lo tanto, es de esperarse que el mecanismo SPGET sea activo para este sistema. La constante de equilibrio calculada para la formación del complejo pre-reactivo, $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{HAsc}^- \rightleftharpoons [\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{HAsc}^-]$, es favorable ($K_{\text{eq}} = 24.1 \text{ M}^{-1}$) y la energía de activación SET para la reacción $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{HAsc}^-] \rightarrow [\text{Trp} \cdots \text{HAsc}^{\bullet}]$ es baja ($\Delta G_{\text{SET}} = 4.35 \text{ kcal/mol}$), datos que indican que el mecanismo SPGET puede ser importante en el proceso de reparación del Trp por $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$. El perfil de reacción se encuentra en el apéndice A2.

6.3.3. Cinética de la reparación de triptófano por ácido ascórbico ($\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$).

En la tabla 6.10 se presentan las constantes de velocidad, calculadas a pH fisiológico, para las reacciones entre los radicales de Trp y $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$. Al igual que para las reacciones con $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$, la energía libre de activación de la etapa elemental SET, en los mecanismos PEST y SPGET, ha sido calculada con base en la teoría de Marcus,^[141-143] así como considerando el pre-equilibrio asociado a la primera etapa de reacción, i.e., $k_{\text{PEST/SPGET}} = K_{\text{eq}} \cdot k_{\text{SET}}$.^[181] Los parámetros asociados a la etapa elemental SET (tabla 6.11) indican que, los procesos de transferencia electrónica ocurren rápida e irreversiblemente, y que la formación de los complejos de transferencia electrónica se encuentra favorecida, i.e., $K_{\text{eq}} > 1 \text{ M}^{-1}$.

Tabla 6.10. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y sus contribuciones a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reacción entre los radicales de Trp y $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$.

| Radical | $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$ | OH | Mecanismo ^[a] | ΔG^\ddagger ^[b] | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------|
| $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ | H_2Asc^- | 1 | PEST | 2.19 | 7.04×10^5 | 0.00 |
| | HAsc^- | 2 | PCET | 2.87 | 1.51×10^9 | 100.00 |
| $\text{Trp}^{\bullet+}$ | HAsc^- | ----- | SPGET | 2.46 | 2.16×10^6 | 0.00 |
| k_{total} | | | | | 1.51×10^9 | 100.00 |

^[a] PEST = Proton-Electron Sequential Transfer, PCET = Proton-Coupled Electron Transfer, SPGET = Sequential Proton Gain-Electron Transfer, ^[b] energía libre de activación (kcal/mol).

De acuerdo a los valores presentados en la tabla 6.10, las constantes de velocidad para el mecanismo PEST y SPGET no ocurren rápidamente a pH fisiológico. La razón para tal resultado, es la baja concentración de H_2Asc y $\text{Trp}^{\bullet+}$ a $\text{pH} = 7.4$. Por otro lado, el mecanismo PCET ocurre para la

reacción entre especies mayoritarias a pH fisiológico, y, por lo tanto, transcurre a velocidades controladas por la difusión. El mecanismo PCET contribuye con el 100% a la k_{total} , al pH considerado, y es 8.4 veces mayor que la constante de velocidad experimental, i.e., $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en pepsina.^[23,27] La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 1.26 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

Tabla 6.11. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET, calculados a 298.15 K, para la reparación de Trp por $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{a}}$.

| Mecanismo | $K_{\text{eq}}^{\text{[a]}}$ | $\Delta G_{\text{SET}}^{\text{[b]}}$ | $\lambda_{\text{i}}^{\text{[c]}}$ | $\lambda_{\text{o}}^{\text{[d]}}$ | $\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger \text{[e]}}$ | k_{SET} |
|-----------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|
| PEST | 33.61 | -4.78 | 19.98 | 5.79 | 4.27 | 4.59×10^9 |
| SPGET | 24.10 | -4.78 | 19.98 | 6.11 | 4.35 | 4.03×10^9 |

^[a] Constantes de equilibrio (M^{-1}); ^[b] energías libres de reacción (kcal/mol); ^[c] energías de reorganización interna (kcal/mol); ^[d] energías de reorganización del solvente (kcal/mol); ^[e] energías libres de activación (kcal/mol); y ^[f] constantes de velocidad SET (s^{-1}).

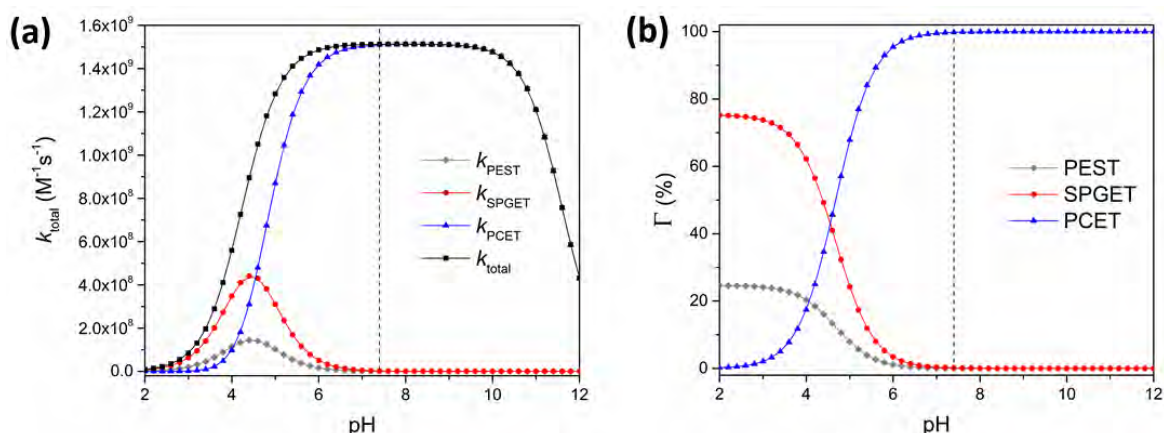


Figura 6.14. Dependencia en el pH para las constantes de velocidad (a) y porcentaje de contribución (b) para los mecanismos PEST, SPGET y PCET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{a}}$.

De forma similar a la reparación del Trp por $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{a}}$, los mecanismos PEST y SPGET adquieren importancia a pH ácidos para la reparación de Trp por $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{a}}$. En la figura 6.14 se muestra la variación de las constantes de velocidad calculadas, así como los valores de Γ (%), en función del pH. Los mecanismos SPGET y PEST alcanzan su valor máximo a un valor de pH = 4.4. Para el mecanismo SPGET, $k_{\text{SPGET}} = 4.41 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y su contribución a la k_{total} es del 49.2 %. Para el mecanismo PEST, $k_{\text{PEST}} = 1.44 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y contribuye con el 16.1 % a la k_{total} . A ese mismo valor de pH, la constante de velocidad para el mecanismo PCET presenta un valor intermedio entre los

valores para los mecanismos PEST y SPGET, $k_{\text{PCET}} = 3.10 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y contribuye con el 34.6 % a la k_{total} .

Con respecto a la reacción en medio lipídico, no fue posible calcular el complejo producto de la transferencia de H^+ entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y H_2Asc en pentiletanoato. Sin embargo, de forma similar al $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{a}}$, se puede esperar que el mecanismo de reacción PEST entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y H_2Asc sea importante bajo ciertas condiciones hidrofóbicas, e.g., para la reparación de Trp en cavidades hidrofóbicas de proteínas.

6.4. Reparación de triptófano por el glutatión (GSH_n^{a}).

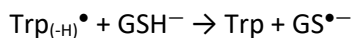
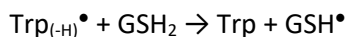
6.4.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y glutatión (GSH_n^{a}).

En la tabla 6.12 se presenta los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para las reacciones (FHT y SET) entre los radicales de Trp y GSH_n^{a} . Las reacciones FHT son exergónicas, valores que indican que pueden participar en la reparación de radicales de Trp. Para el mecanismo SET, se determinó que la reacción entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y GSH^- es altamente endergónica, mientras que la reacción entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y GS^{2-} es altamente exergónica. Esto indica que el grupo $-\text{SH}$ es un mal donador de electrones, y, por otro lado, su base conjugada, el tiolato ($-\text{S}^-$), es un excelente donador de electrones.

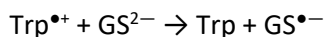
Tabla 6.12. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Trp por el GSH_n^{a} .

| Reacción | Radical | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|------------------------------------|------------------|------------------------|------------------------|
| FHT | $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ | GSH_2 | -7.53 | -6.79 |
| | | GSH^- | -6.42 | -6.44 |
| SET | $\text{Trp}^{\bullet+}$ | GSH_2 | 20.44 | 20.60 |
| | | GSH^- | 27.86 | 29.55 |
| | GS^{2-} | -20.87 | -19.58 | |
| | $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ | GSH_2 | 44.47 | 43.91 |
| | | GSH^- | 51.89 | 52.87 |
| | | GS^{2-} | 3.16 | 3.73 |

Por lo tanto, dos caminos de reacción pueden llegar a ser relevantes para la determinación de los mecanismos de reacción que dan origen a las constantes de velocidad observadas a nivel experimental. Las reacciones FHT entre $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y las fracciones GSH_2 y GSH^- ,



y la reacción SET entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y GS^{2-} ,



Para la reacción FHT con la fracción GSH_2 , los efectos entrópicos son favorables ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = 0.74$ kcal/mol), y para la reacción con la fracción GSH^{-} , son despreciables ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = -0.01$ kcal/mol). La contribución entrópica favorable al valor de ΔG_{rx} , para la reacción entre el $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y GSH_2 , proviene, principalmente, de la variación de entropía vibracional durante el proceso de oxidación del reparador ($T \cdot \Delta S_{\text{vib}} = 0.45$ kcal/mol). Sin embargo, la fuerza impulsora de las reacciones FHT es la variación de entalpía. El enlace N-H en el Trp es 6.9 y 6.5 kcal/mol más fuerte comparado al enlace S-H en el GSH_2 y GSH^{-} , respectivamente.

Para la reacción SET entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y GS^{2-} , el cambio de entropía favorece el proceso de reparación ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = 0.90$ kcal/mol). En este caso, se presenta un aumento en la entropía vibracional del reparador, i.e., $T \cdot \Delta S_{\text{vib}} = 1.24$ kcal/mol para la oxidación de GS^{2-} .

6.4.2. Mecanismos de reparación de radicales de Trp por el glutatión (GSH_n^q).

Para la reparación de Trp por GSH_n^q , tres reacciones mostraron ser viables termodinámicamente. Las reacción FHT entre $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y las fracciones GSH_2 y GSH^{-} , con valores de ΔG_{FHT} de -7.53 kcal/mol y -5.82 kcal/mol, respectivamente. Y la reacción SET entre el catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ y el di-anión GS^{2-} , con un valor de $\Delta G_{\text{SET}} = -20.87$ kcal/mol. De acuerdo a los valores de pK_a para el $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ (4.7) y GSH^{-} (8.75 para el grupo -SH),^[16,157,158] la probabilidad de intercambio de H^+ es baja, por lo tanto es de esperarse que la reacción FHT ocurra a través de un mecanismo concertado (HAT o PCET). La predicción de una reacción SET viable entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y GS^{2-} es congruente con los valores de potencial redox para tales especies, 0.94 V (pH = 3) y 0.80 V (pH = 13),^[157,180] respectivamente, aunque difiere considerablemente del valor esperado ($E_{\text{celda}} = 0.14$ V y $\Delta G_{\text{SET}} = -3.23$ kcal/mol).

6.4.2.1. Reparación de Trp por la fracción neutra del glutatión (GSH_2).

En la figura 6.15, se presenta la variación de cargas NPA y densidad de espín de Hirshfeld en función del IRC. La carga del núcleo transferido varía de 0.25e a 0.42e en la región analizada del IRC, comportamiento que indica que la partícula va adquiriendo la carga característica de un H^+ a medida

que el sistema evoluciona desde reactivos hacia productos. La densidad de espín sobre el donador y el núcleo transferido son 0.004-0.007 y 0.004-0.006, valores que demuestran que el TS calculado corresponde a un TS de una superficie de transferencia de H^+ , y, por lo tanto, no se observa la inversión de espín entre el donador y aceptor característica para reacciones concertadas en la que el e^- se transfiere simultáneamente con el H^+ . La densidad de los orbitales HOMO y SOMO confirma que la superficie estudiada corresponde a una superficie de transferencia de H^+ , i.e., el orbital HOMO y SOMO se encuentran completamente localizados sobre el donador y aceptor, respectivamente. Por lo tanto, la reacción entre el radical neutro $Trp_{(-H)}^\bullet$ y la fracción completamente protonada del glutatión, GSH_2 , ocurre a través de un mecanismo secuencial PEST. Sin embargo, como puede esperarse desde los valores de pK_a de los reactivos, la formación del complejo producto de la transferencia de H^+ , $Trp_{(-H)}^\bullet + GSH_2 \rightleftharpoons [Trp^{\bullet+} \cdots GSH^-]$, se encuentra altamente desfavorecido, i.e., $K_{eq} = 8.67 \times 10^{-8} M^{-1}$. De acuerdo a esto, la reacción de reparación entre $Trp_{(-H)}^\bullet$ y GSH_2 no debe contribuir de forma importante al proceso de reparación global de radicales de Trp por el GSH_n^9 , como fue confirmado por el análisis cinético, sección 6.4.3.

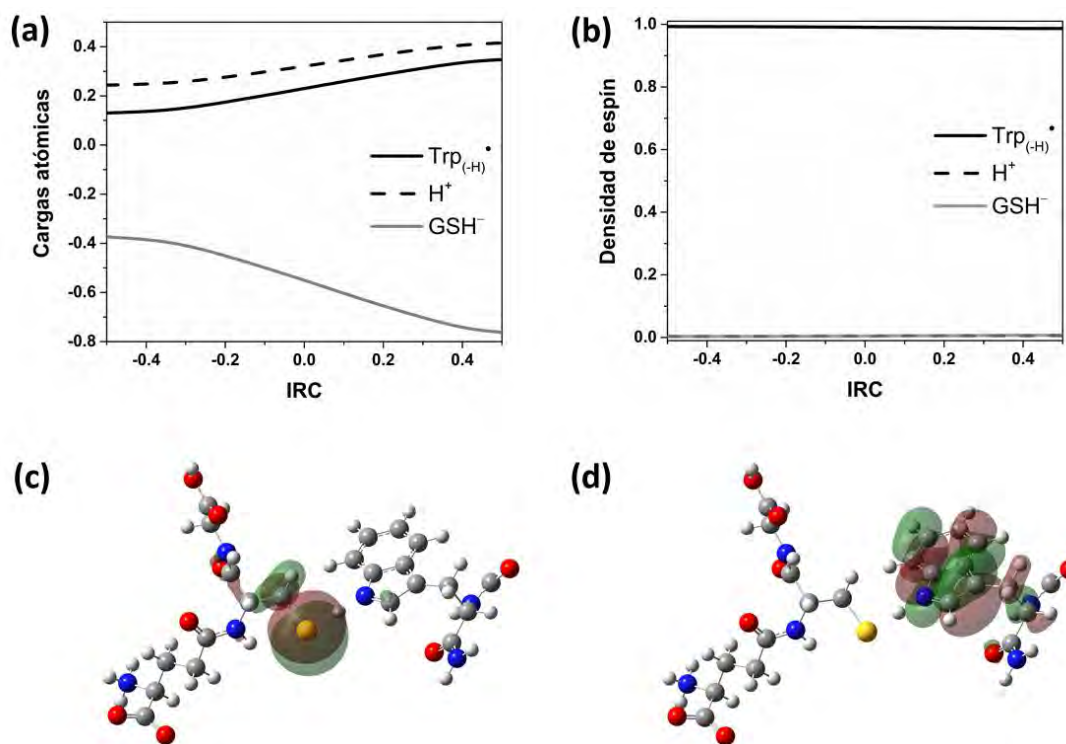


Figura 6.15. Reacción de reparación entre el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ y GSH_2 . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

6.4.2.2. Reparación de Trp por la fracción mono-aniónica del glutatión (GSH^-).

De la misma forma que la fracción GSH_2 , el mono-anión GSH^- reacciona con el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ a través de un mecanismo de reacción secuencial PEST. En la figura 6.16 se presenta la variación de cargas NPA y densidades de espín Hirshfeld para la reparación del $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ por GSH^- . La carga del núcleo transferido varía de 0.24e a 0.42e en la región analizada (coordenada de reacción entre -0.5 y 0.5), adquiriendo la carga característica de un H^+ durante el proceso de transferencia. La densidad de espín para el núcleo transferido es 0.004-0.007, valores que confirman el carácter de H^+ . Por otro lado, los orbitales HOMO y SOMO en la geometría del TS, presentan las características asociadas a un TS para una reacción de transferencia de H^+ , i.e., el orbital HOMO se encuentra localizado sobre el donador y el orbital SOMO sobre el aceptor (figura 6.16). El total de los resultados indican que, la superficie de energía potencial sobre la que evoluciona el TS calculado, corresponde a una superficie de transferencia de H^+ .

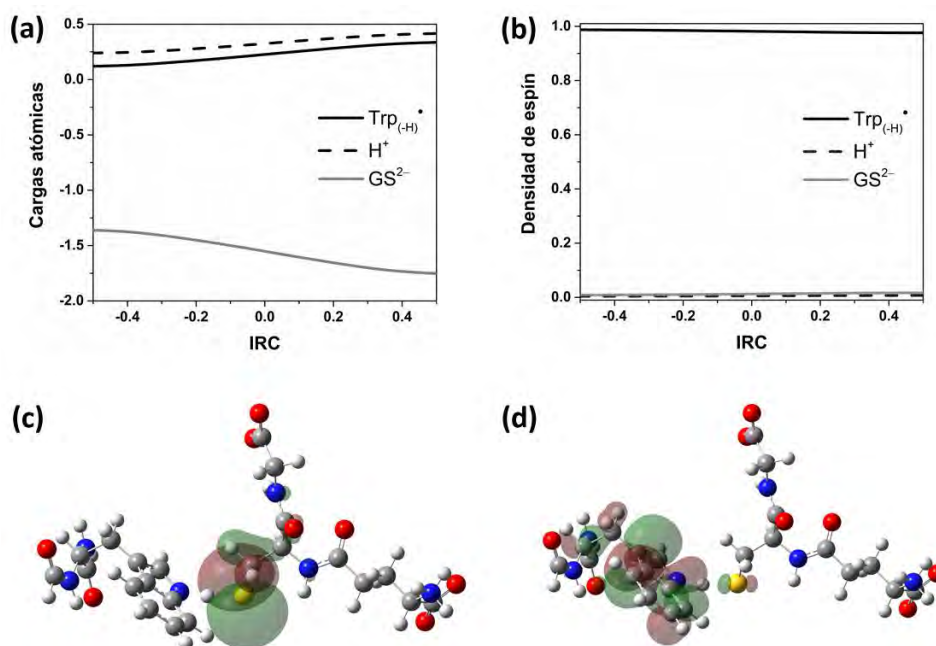


Figura 6.16. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y GSH^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

El comportamiento PEST es inesperado al considerar los valores de pK_a de los reactivos, i.e., la constante de equilibrio (K_{eq}) calculada para la reacción $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{GSH}^- \rightleftharpoons [\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{GS}^{2-}]$ es $7.91 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, sin embargo, la segunda etapa de reacción, $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{GS}^{2-}] \rightarrow [\text{Trp} \cdots \text{GS}^{\bullet-}]$, es lo

suficientemente exergónica ($\Delta G_{\text{SET}} = -12.31$ kcal/mol) como para impulsar la reacción y hacer irreversible al proceso global. Por lo tanto, el mecanismo de reparación identificado corresponde un mecanismo PEST, el cual, como consecuencia de la K_{eq} para la transferencia de H^+ , no debe aportar de forma significativa al proceso global de reparación, i.e., la reacción es lenta.

6.4.2.3. Reparación de Trp por la fracción di-aniónico del glutatión (GS^{2-}).

La reparación mediada por el di-anión GS^{2-} ocurre a través del mecanismo SPGET. En la primera etapa, se protona el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ desde el medio y forma el catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$. En la segunda etapa, se forma el complejo iónico $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{GS}^{2-}]$, proceso altamente favorecido ($K_{\text{eq}} = 3.81 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$). En la tercera etapa, ocurre la transferencia electrónica con una energía de activación baja ($\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger} = 0.90$ kcal/mol), dando origen la formación del complejo de enlace de hidrógeno entre productos de reparación, $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{GS}^{2-}] \rightarrow [\text{Trp} \cdots \text{GS}^{\bullet-}]$. Y, finalmente, el complejo $[\text{Trp} \cdots \text{GS}^{\bullet-}]$ se disocia en el Trp reparado y el anión radical $\text{GS}^{\bullet-}$. En la figura 6.17 se presenta el perfil de reacción SPGET y los parámetros asociados a cada etapa de reacción, los cuales son necesarios para el cálculo de la energía de activación y constante de velocidad del proceso, i.e., K_{eq} , ΔG_{SET} y λ .

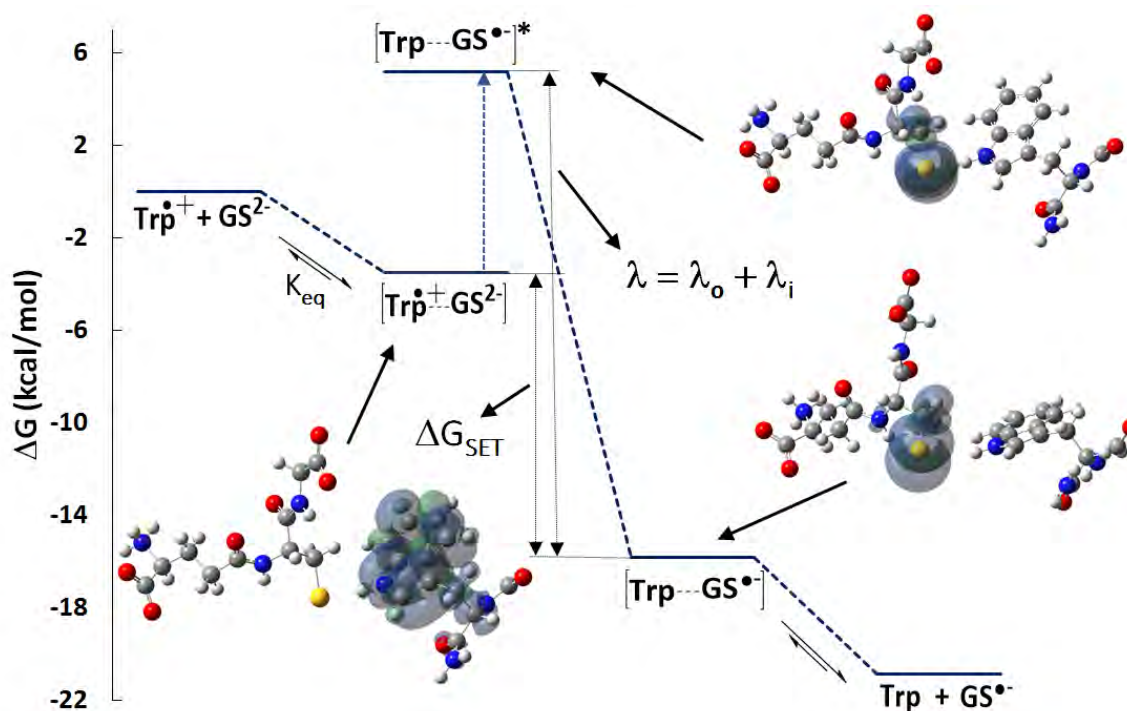


Figura 6.17. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por GS^{2-} a través del mecanismo de reacción SPGET. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

6.4.3. Cinética de la reparación de triptófano por glutatión (GSH_n^q).

En la tabla 6.13 se presentan los resultados del análisis cinético para la reparación de Trp por GSH_n^q, en medio acuoso. Los mecanismos PEST presenta un valor de ΔG^\ddagger alto, consecuencia de los valores de pK_a para Trp_(-H)[•] y el grupo SH en el GSH_n^q, i.e., 4.7 y ~8.8,^[83,84] respectivamente, que dan origen a valores para la K_{eq} de 8.66×10^{-8} (GSH₂) y 7.91×10^{-9} (GSH⁻) M⁻¹. Sin embargo, una vez ocurre la transferencia de H⁺, la etapa SET ocurre rápidamente, tabla 6.14. Para la reacción PEST, mediada por la fracción GSH₂, no fue posible localizar el complejo producto de la transferencia electrónica, [Trp[•]...GSH[•]], y el valor de ΔG_{SET} se calculó utilizando los productos de la disociación de dicho complejo, i.e., [Trp^{•+}...GSH⁻] → Trp y GSH[•].

Tabla 6.13. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(pH=7.4)}$, M⁻¹s⁻¹) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación de los radicales de Trp por el GSH_n^q.

| Radical | GSH _n ^q | Mecanismo ^[a] | ΔG^\ddagger | $k^{(pH=7.4)}$ | Γ |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|----------|
| Trp ^{•(-H)} | GSH ₂ | PEST | 8.54 | 1.83×10^3 | 0.29 |
| | GSH ⁻ | PEST | 11.90 | 1.13×10^4 | 1.78 |
| Trp ^{•+} | GS ²⁻ | SPGET | 0.00 | 6.25×10^5 | 97.94 |
| | | | | k_{total} | 100 |

^[a] PEST = Proton-Electron Sequential Transfer, y SPGET = Sequential Proton Gain-Electron Transfer.

Tabla 6.14. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET, calculados a 298.15 K, para la reparación de Trp por GSH_n^q.

| Mecanismo | GSH _n ^q | K _{eq} ^[a] | ΔG_{SET} ^[b] | λ_i ^[c] | λ_o ^[d] | ΔG^\ddagger_{SET} ^[e] | k_{SET} |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| PEST | GSH ₂ | 8.66×10^{-8} | -16.33 | 18.06 | 6.95 | 0.75 | 1.74×10^{12} |
| PEST | GSH ⁻ | 7.91×10^{-9} | -12.31 | 14.03 | 6.62 | 0.84 | 1.50×10^{12} |
| SPGET | GS ²⁻ | 3.81×10^2 | -12.31 | 14.03 | 6.99 | 0.90 | 1.35×10^{12} |

^[a] Constantes de equilibrio (M⁻¹); ^[b] energías libres de reacción (kcal/mol); ^[c] energías de reorganización interna (kcal/mol); ^[d] energías de reorganización del solvente (kcal/mol); ^[e] energías libres de activación (kcal/mol); y ^[f] constantes de velocidad SET (s⁻¹).

El mecanismo SPGET corresponde al camino de reacción dominante, con una contribución a la k_{total} del 98.22 %. La constante de equilibrio de formación del complejo de reactivos, [Trp^{•+}...GS²⁻], para la etapa SET, se encuentra altamente favorecida, i.e., K_{eq} = 3.81×10^2 M⁻¹, tabla 6.14, razón por la cual el proceso global ocurre sin barrera, i.e., $\Delta G^\ddagger_{SPGET}$ = 0.00 kcal/mol. Este resultado demuestra la

importancia de considerar las especies minoritarias provenientes de los equilibrios ácido-base en medio acuoso. La k_{total} calculada a pH fisiológico, es 5.8 veces mayor que la constante experimental, i.e., $k_{\text{exp}} = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $\text{pH} = 7.4$ para la *N*-acetil triptófano amida.^[22,24,27] La diferencia entre el valor de k_{global} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 1.04 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

Para este caso de estudio, la dependencia de las constantes de velocidad en el pH (figura 6.18), difiere mucho con respecto a lo observado para la reparación de Trp por $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ y $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$. El máximo para las constantes de velocidad para los mecanismos SPGET y PEST, ocurren a un valor de $\text{pH} = 6.7$, $k_{\text{SPGET}} = 6.40 \times 10^5$ y $k_{\text{PEST}} = 1.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El mecanismo PEST no incrementa su contribución al valor de k_{total} con la variación del pH. Por lo tanto, la reparación de Trp por GSH_n^{q} no es importante a valores de pH muy inferiores al fisiológico.

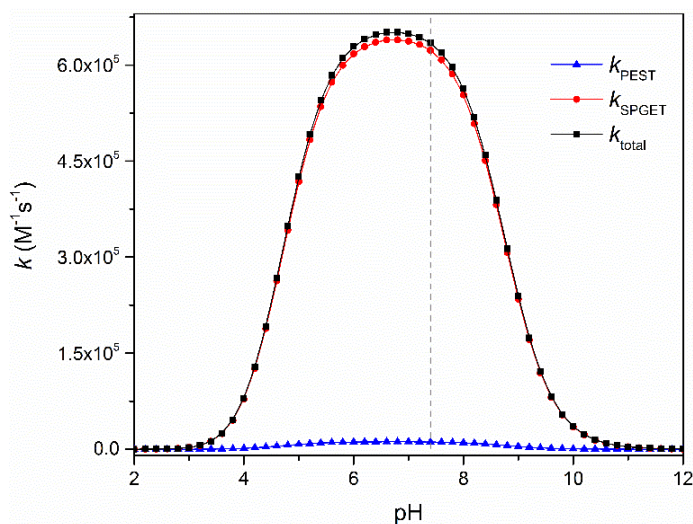


Figura 6.18. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PEST y SPGET, para la reparación de radicales de Trp por el GSH_n^{q} .

6.5. Reparación de triptófano por el trolox ($\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$).

6.5.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y trolox ($\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$).

En la tabla 6.15, se presenta los datos de viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación de los radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$. Las dos reacciones FHT entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y las fracciones de H_2Tx y HTx^- , mostraron ser altamente favorables. Por otro lado, las reacciones SET entre el catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ y las dos fracciones de $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$ consideradas, pueden ser importantes para el proceso de

reparación. Por lo tanto, las reacciones que deben ser consideradas en la determinación de los mecanismos de reparación de Trp por el H_nTx^q , son:

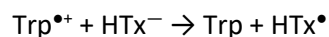
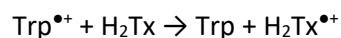
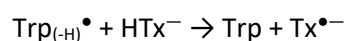
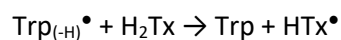


Tabla 6.15. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Trp por el H_nTx^q .

| Reacción | Radical | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|----------------------|-----------|-----------------|-----------------|
| FHT | $Trp_{(-H)}^\bullet$ | H_2Tx | -12.01 | -12.07 |
| | | HTx^- | -14.66 | -13.89 |
| SET | $Trp^{\bullet+}$ | H_2Tx | -2.12 | -3.06 |
| | | HTx^- | -7.24 | -7.23 |
| | $Trp_{(-H)}^\bullet$ | H_2Tx | 21.07 | 20.13 |
| | | HTx^- | 15.95 | 15.96 |

Los efectos entrópicos para la reacción FHT, mediada por la fracción HTx^- , son favorables ($T \cdot \Delta S_{rx} = 0.77$ kcal/mol), para la reacción entre el catión radical $Trp^{\bullet+}$ y el H_2Tx , son desfavorable ($T \cdot \Delta S_{rx} = -0.94$ kcal/mol), y para las dos reacciones restantes, son despreciables. La contribución entrópica favorable para la reacción $Trp_{(-H)}^\bullet + HTx^-$, se encuentra asociada al aumento de entropía vibracional al pasar del mono-anión HTx^- al anión radical $Tx^{\bullet-}$ ($T \cdot \Delta S_{vib} = 0.50$ kcal/mol), i.e., la torsión de dos de los grupos CH_3 del anillo aromático, alrededor del enlace C-C, se encuentra menos impedida (esquema 6.7). Para la reacción SET entre $Trp^{\bullet+}$ y H_2Tx , el efecto entrópico desfavorable es consecuencia de una disminución en entropía vibracional por la oxidación del H_2Tx , i.e., $T \cdot \Delta S_{vib} = -0.91$ kcal/mol.

La fuerza motriz de las reacciones de reparación es la variación de entalpía, i.e., la energía del enlace N-H formado en el Trp, es 11.4 y 14.1 kcal/mol más fuerte en comparación al enlace O-H en el H_2Tx y HTx^- , respectivamente.

Para la reparación de Trp por el H_nTx^q en pentiletanoato, solo existe una posibilidad, la reacción entre el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ y la fracción neutra H_2Tx . Los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} de reacción son -13.30 y

-14.26 kcal/mol, respectivamente. Esos valores indican que, la reacción de reparación se encuentra altamente favorecida en medio lipídico, incluso más que en medio acuoso, i.e., el valor de ΔG_{rx} es -1.28 kcal/mol más exergónico en pentiletanoato en comparación al medio acuoso. La reacción se encuentra desfavorecida entrópicamente, consecuencia de la disminución de entropía vibracional de las especies reaccionando, i.e., $T \cdot \Delta S_{vib}$ es -0.51 y -0.47 kcal/mol para la oxidación del reparador y reducción del radical, respectivamente. Por consiguiente, la variación de entalpía es la fuerza motriz de la reacción.

6.5.2. Mecanismos de reparación de radicales de Trp por el trolox (H_nTx^q).

Los datos de viabilidad termodinámica en medio acuoso, presentados en la tabla 6.15, revelaron la existencia de cuatro reacciones que pueden ser importantes para los procesos de reparación de los radicales de Trp por el H_nTx^q . Dos reacciones FHT y dos reacciones SET. A continuación, se presentan los resultados del análisis mecanístico para esas reacciones.

6.5.2.1. *Reparación de Trp por la fracción completamente protonada del trolox (H_2Tx).*

Los valores de pK_a de los reactivos indican que es poco probable el intercambio de un H^+ entre el OH fenólico y el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$, i.e., los valores de pK_a son 11.9 y 4.7,^[163,165] respectivamente, por lo que se descarta la posibilidad de un mecanismo PEST. Los potenciales de reducción para el H_2Tx (pH = 0) y $Trp_{(-H)}^\bullet$ (pH = 13) son 0.89 y 0.56 V,^[92,165,180] respectivamente, valores que sugieren que una reacción SET se encuentra desfavorecida, i.e., no es posible la ocurrencia de un mecanismo EPST. Por lo tanto, la reacción entre el H_2Tx y $Trp_{(-H)}^\bullet$ debe ocurrir a través de los mecanismos concertados HAT o PCET.

En la figura 6.19, se presentan las variaciones de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld a través de la coordenada de reacción. La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.006-0.010, respectivamente, valores asociados a un H^+ . Se observa la inversión de la carga y densidad de espín entre el donador y aceptor muy cerca del TS, i.e., la densidad de espín sobre el aceptor y donador a la geometría del TS son 0.544 y 0.447, respectivamente. El hecho de que las curvas del aceptor y donador se crucen en el perfil de evolución de cargas, es consecuencia de la carga total del sistema, i.e., el sistema es neutro. Los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados sobre el donador y aceptor a la geometría del TS y revela la existencia de interacciones π - π *stacking*. Por lo tanto, la transferencia del H^+ y e^- ocurren en una etapa de

reacción y el mecanismo debe ser clasificado como PCET. Las interacciones π - π *stacking* abren el canal de transferencia electrónica que permite que el H^+ y e^- se encuentren desacoplados.

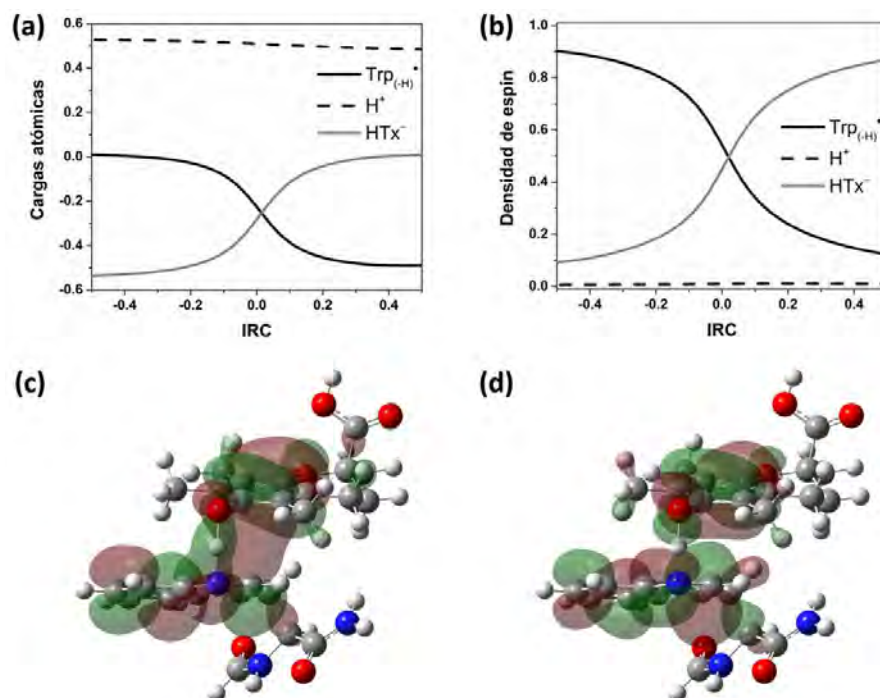


Figura 6.19. Reacción de reparación entre el radical $Trp_{(-H)}\bullet$ y H_2Tx . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

Los datos de viabilidad termodinámica presentados en la tabla 6.14, mostraron que la reacción SET entre catión radical $Trp^{\bullet+}$ y la fracción completamente protonada H_2Tx es termodinámicamente favorable, i.e., $\Delta G_{SET} = -2.12$ kcal/mol. Tal valor de ΔG_{SET} concuerda con lo esperado desde los potenciales de óxido-reducción de los reactivos, i.e., los valores de E_0' vs NHE para H_2Tx y $Trp^{\bullet+}$ son 0.89 V (pH = 7) y 0.94 V (pH = 3), respectivamente,^[92,165,180] y $\Delta G_{SET} = -1.15$ kcal/mol (para $E_{celda} = 0.05$ V). Por lo tanto, la reacción SET entre $Trp^{\bullet+}$ y H_2Tx , puede ser un mecanismo de reparación activo, y, por lo tanto, debe considerarse en el análisis cinético de la reparación de radicales de Trp por el H_nTx^d .

Los resultados del análisis mecanístico en pentiletanoato, indicaron que la reacción de reparación del radical neutro $Trp_{(-H)}\bullet$ por el H_2Tx , presenta todas las características asociadas a un mecanismo PCET, i.e., el mecanismo de reparación no cambia al pasar de medio acuoso a medio lipídico.

6.5.2.2. Reparación de Trp por la fracción mono-aniónica del trolox (HTx^-).

El valor de pK_a del OH fenólico es 11.9,^[165] razón por la cual, la posibilidad de una transferencia de H^+ hacia el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ es poco probable, lo que descarta la posibilidad de un mecanismo de reparación PEST. El potencial de reducción del HTx^- a $\text{pH} = 7$ (la fracción de HTx^- es 99.99%) y del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ a $\text{pH} = 13$ (la fracción de $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ es del 100%) son 0.48 y 0.56 V,^[165,180] valores que indican que una etapa de reacción SET se encuentra favorecida termodinámicamente ($E_{\text{celda}} = 0.08 \text{ V}$ y $\Delta G = -1.84 \text{ kcal/mol}$). Sin embargo, el valor de ΔG_{SET} calculado (15.95 kcal/mol, tabla 6.15), demostró que la reacción es altamente endérgica, valor que se encuentra por encima de cualquier inexactitud que pueda asociarse a los cálculos realizados en este trabajo. En consecuencia, la posibilidad de un mecanismo de reacción EPST, queda descartado. Por lo tanto, el mecanismo de reacción probable corresponde a una reacción concertada HAT o PCET.

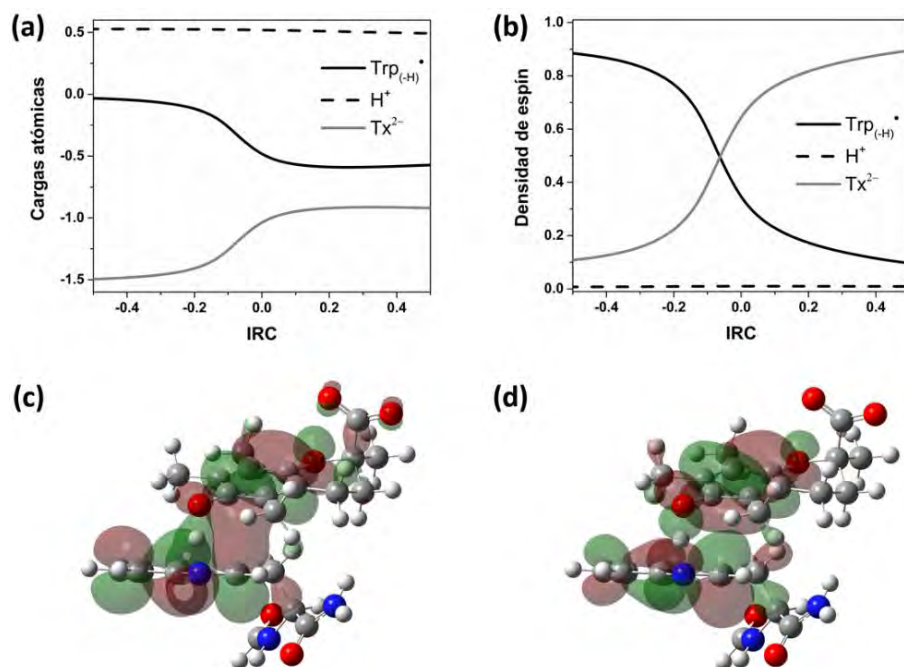


Figura 6.20. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y HTx^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

En la figura 6.20, se presentan los perfiles de evolución de cargas NPA y densidades de espín a través de la coordenada de reacción. La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.007-0.010, respectivamente, valores que indican que la partícula transferida corresponde a un H^+ . En el perfil de evolución de espín, se observa una inversión de la densidad de espín entre el donador

y aceptor antes de la geometría del TS, comportamiento asociado a un mecanismo PCET con asincronía en la dirección de EPST. Los orbitales HOMO y SOMO, en la geometría del TS, se encuentran deslocalizados sobre el donador y aceptor, y demostraron la existencia de interacciones π - π *stacking*. En conclusión, el análisis mecanístico demostró que la reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y el mono-anión HTx^- , ocurre a través de un mecanismo concertado PCET asincrónico.

Los datos de viabilidad termodinámica presentados en la tabla 6.15, indican que la reacción entre catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ y el mono-anión HTx^- se encuentra favorecida, i.e., $\Delta G_{\text{SET}} = -7.24$ kcal/mol. En este caso, el valor de ΔG_{SET} concuerda con lo esperado desde los potenciales de óxido-reducción de los reactivos, i.e., los valores de E_0' vs NHE para HTx^- y $\text{Trp}^{\bullet+}$ son 0.48 V (pH = 7) y 0.94 V (pH = 3),^[165,180] respectivamente, por lo tanto, $E_{\text{celda}} = 0.46$ V y $\Delta G = -10.61$ kcal/mol. Por consiguiente, la reacción SET entre $\text{Trp}^{\bullet+}$ y HTx^- , es un mecanismo de reparación activo y debe considerarse en el análisis cinético de la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$.

6.5.3. Cinética de la reparación de triptófano por el trolox ($\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$).

En la tabla 6.16 se presentan los resultados del análisis cinético para las reacciones de reparación del Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$. Las reacciones del radical neutro $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ con las fracciones H_2Tx y HTx^- , ocurren a través del mecanismo PCET. La reacción con la fracción H_2Tx es lenta, y moderadamente rápida para el mono-anión HTx^- , i.e., $k^{(\text{pH}=7.4)}$ es 1.54×10^2 y 1.97×10^6 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. La reacción PCET con la fracción HTx^- contribuye con el 37.79% al valor de k_{total} , característica que demuestra su importancia para los procesos de reparación.

Tabla 6.16. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación de los radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$.

| Radical | $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$ | Mecanismo ^[a] | ΔG^\ddagger [b] | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ | |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-----|
| $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ | H_2Tx | PCET | 10.02 | 1.54×10^2 | 0.00 | |
| | HTx^- | PCET | 8.86 | 1.97×10^6 | 37.79 | |
| $\text{Trp}^{\bullet+}$ | H_2Tx | SET | 6.88 | 3.46×10^1 | 0.00 | |
| | HTx^- | SET | 4.72 | 3.23×10^6 | 62.21 | |
| | | | | k_{total} | 5.20×10^6 | 100 |

^[a] PCET = Proton-Coupled Electron Transfer, y SET = Single Electron Transfer.

Por otro lado, la reparación del catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ puede ocurrir a través de una reacción SET con las dos fracciones del reparador. Sin embargo, la reacción con la fracción H_2Tx no contribuye de forma importante a la reparación a pH fisiológico, consecuencia de la baja concentración de los reactivos a $\text{pH} = 7.4$. La reacción con el mono-anión HTx^- , ocurre a velocidades moderadamente rápidas ($k^{\text{pH}=7.4} = 3.23 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y contribuye con el 62.21% al valor de k_{total} , por lo tanto, corresponde al principal mecanismo de reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$. La reacción entre el $\text{Trp}^{\bullet+}$ y HTx^- , ocurre a velocidades cerca del límite por difusión a valores de pH ácidos, i.e., a $\text{pH} = 5$ el valor de k_{SET} es $5.04 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El perfil de variación de las k de velocidad en función del pH, se presenta en la figura 6.21.

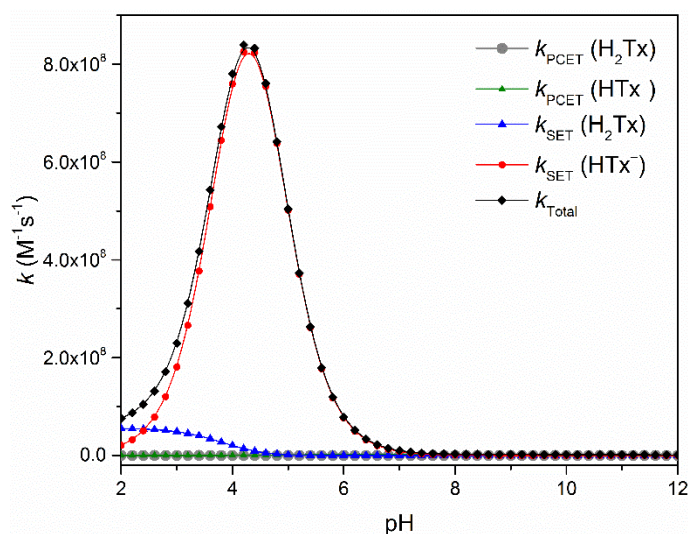


Figura 6.21. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PCET y SET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$.

La k_{total} de velocidad calculada a pH neutro ($k_{\text{total}} = 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $\text{pH} = 7$) es 3.9 veces más pequeña que la k de velocidad experimental ($k_{\text{exp}} = 3.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $\text{pH} = 7$ para el Trp libre),^[18] resultado que demuestra la validez de la metodología utilizada para realizar el análisis cinético en medio acuoso. La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 0.81 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

Con respecto a la reparación en medio lipídico, la reacción entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y el H_2Tx , presenta una energía de activación alta ($\Delta G^\ddagger = 10.15 \text{ kcal/mol}$), y por lo tanto, ocurre a velocidades moderadas ($2.24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Sin embargo, la velocidad a la que ocurre la reparación en medio

lipídico, es lo suficientemente rápida como para competir con la segunda etapa de daño, la adición de $^3\text{O}_2$ al radical de Trp, reacción que tiene una k de velocidad $\sim 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[186]

6.6. Reparación de triptófano por el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

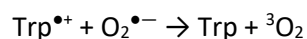
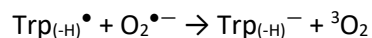
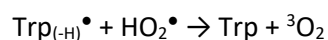
6.6.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de triptófano y el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

En la tabla 6.17, se presentan los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para las posibles reacciones de reparación consideradas. La reacción FHT entre el radical $\text{Trp}_{(-H)}^{\bullet}$ y el radical HO_2^{\bullet} , para formar el Trp reparado y $^3\text{O}_2$, es altamente exergónica. Como era de esperarse, la transferencia electrónica desde el radical HO_2^{\bullet} se encuentra desfavorecida porque el producto formado corresponde al $^3\text{O}_2$ protonado. Sin embargo, por ser una de las combinaciones posibles, se ha realizado el análisis termodinámico para esas reacciones. Por otro lado, la transferencia electrónica desde el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, hacia los dos radicales de Trp, se encuentra termodinámicamente favorecida y mostraron ser altamente exergónicas.

Tabla 6.17. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Trp por los radicales HO_2^{\bullet} y $\text{O}_2^{\bullet-}$.

| Reacción | Radical | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| FHT | $\text{Trp}_{(-H)}^{\bullet}$ | HO_2^{\bullet} | -33.48 | -35.29 |
| SET | $\text{Trp}^{\bullet+}$ | HO_2^{\bullet} | 48.01 | 47.73 |
| | | $\text{O}_2^{\bullet-}$ | -36.54 | -36.87 |
| | $\text{Trp}_{(-H)}^{\bullet}$ | HO_2^{\bullet} | 71.21 | 70.92 |
| | | $\text{O}_2^{\bullet-}$ | -13.34 | -13.67 |

Por lo tanto, tres reacciones pueden ser importantes para los procesos de reparación de radicales de Trp mediados por los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet} , una reacción FHT y dos reacciones SET:



La reacción FHT se encuentra desfavorecida entrópicamente, $T \cdot \Delta S_{rx} = -1.81 \text{ kcal/mol}$. Para este caso, la variación de la entropía rotacional al pasar de HOO^{\bullet} a $^3\text{O}_2$, corresponde a la principal contribución negativa a la entropía de reacción ($T \cdot \Delta S_{rot} = -1.88 \text{ kcal/mol}$).

Nótese que, todas las reacciones dan origen a la formación de $^3\text{O}_2$, ya que, de otra forma, se produciría $^1\text{O}_2$, especie oxidante que podría hacer reversible los procesos de reparación, i.e., E_0' (vs. NHE) = 0.81 V a pH = 7 para la semicelda $^1\text{O}_2, e^- / \text{O}_2^{\bullet-}$.

En pentiletanoato, la única fracción disponible de la especie reparadora, corresponde al radical neutro HOO^\bullet . Los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para la reacción FHT indica que el proceso se encuentra termodinámicamente favorecido, i.e., -39.68 y -42.23 kcal/mol, respectivamente. El ΔG_{rx} en pentiletanoato es -6.20 kcal/mol más exergónico en comparación a la reacción en agua, sin embargo, la reacción se encuentra desfavorecida entrópicamente, $T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = -2.55$ kcal/mol. Para este caso particular, la variación de la entropía rotacional al pasar de HOO^\bullet a $^3\text{O}_2$, corresponde a la principal contribución negativa la entropía de reacción ($T \cdot \Delta S_{\text{rot}} = -1.89$ kcal/mol), seguida por la variación en entropía vibracional asociada a la reducción del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ ($T \cdot \Delta S_{\text{vib}} = -0.47$ kcal/mol). La variación de entalpía es la fuerza motriz de la reacción.

6.6.2. Mecanismos de reparación de radicales de Trp por el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Los datos de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} presentados en la tabla 6.17, indican que existen tres reacciones que pueden ser importantes para la reparación de radicales de Trp por el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$: $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-}$, y $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{HOO}^\bullet$. Las dos primeras, corresponden a reacciones de transferencia electrónica, y la última a una reacción FHT. A continuación, se discuten los detalles mecanísticos para esas tres reacciones.

6.6.2.1. Reparación de Trp por la fracción completamente protonada del anión radical superóxido (HO_2^\bullet).

El anión radical superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$, se encuentra en equilibrio ácido-base con el radical hidroperoxilo, HOO^\bullet . El valor de pK_a del radical HOO^\bullet es igual a 4.8,^[49] y el potencial de reducción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a pH = 7 es -0.18 V (E_0' vs NHE, $^3\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$),^[29] valores que indican que el radical HOO^\bullet podría reaccionar con el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ a través de un mecanismo PEST, i.e., el catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ tiene un valor de $\text{pK}_a = 4.7$ y un potencial de reducción 0.94 V (pH = 3). En este caso particular, la reacción ocurre entre dos radicales libres, y, por lo tanto, existen dos estados electrónicos posibles para el intermediario de transferencia de H^+ : singulete o triplete. Si el intermediario se encuentra en un estado singulete, se liberaría $^1\text{O}_2$ en la segunda etapa de reacción del mecanismo PEST, y si se encuentra en un estado triplete, se liberaría $^3\text{O}_2$. La formación de $^1\text{O}_2$ ($E^{0'} = 0.81$ V a pH = 7),^[29] mucho menos estable, podría hacer reversible el proceso de reparación,^[187] o inducir la oxidación de otros residuos de

aminoácidos o bases nitrogenadas del ADN,^[61-63,188] efectos secundarios que no se presentarían con la generación de $^3\text{O}_2$. Adicionalmente, la reacción $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{HOO}^\bullet \rightarrow \text{Trp} + ^1\text{O}_2$ se encuentra termodinámicamente desfavorecida, i.e., $\Delta G_{\text{FHT}} = 6.67 \text{ kcal/mol}$. Por lo tanto, en este trabajo, se ha estudiado la reacción sobre una superficie de reacción en estado triplete.

En la figura 6.22 se presenta la evolución de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld en función del IRC. La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y $0.020\text{-}0.023$, respectivamente, valores que pueden ser asociados a un H^+ . Debido a que la reacción ocurre sobre una superficie triplete, el aceptor y donador presentan un valor de espín de ~ 1 , y se conservan durante el proceso de transferencia de H^+ , comportamiento que indica que el TS calculado evoluciona sobre una superficie de transferencia de H^+ , i.e., el espín del donador y aceptor se conserva sobre la superficie de energía potencial asociada al TS.

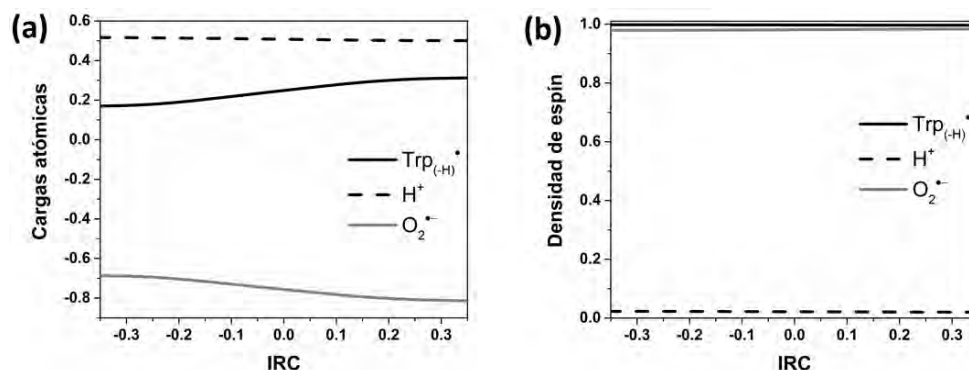


Figura 6.22. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y HOO^\bullet . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción.

Una vez se forma el complejo iónico $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{O}_2^{\bullet-}]$ ($K_{\text{eq}} = 2.23 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), producto de la transferencia de H^+ , ocurre la transferencia electrónica. En la figura 6.23 se presenta la diferencia de densidad electrónica total para el complejo de transferencia de H^+ antes y después de la transferencia electrónica vertical. Las regiones de color púrpura corresponden a regiones donde ocurrió un aumento de la densidad electrónica, y las regiones azules donde ocurrió una disminución de densidad electrónica. La figura 6.23 demuestra que ocurre una disminución de densidad electrónica sobre el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ y un aumento sobre el Trp, consecuencia de la transferencia electrónica vertical. Una vez ocurre dicha transferencia, el complejo se relaja vibracionalmente, dando origen a la formación de un complejo conformado por el Trp reparado y el $^3\text{O}_2$, complejo muy débilmente enlazado, que se disocia para dar origen los productos finales.

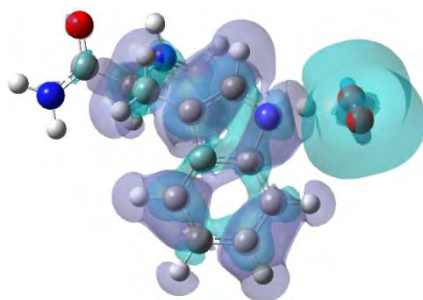


Figura 6.23. Variación de densidad electrónica después de la transferencia electrónica vertical para el complejo $[\text{Trp}^{\bullet+}\cdots\text{O}_2^{\bullet-}]$. Las regiones purpuras y azules se encuentran asociadas al aumento y disminución de la densidad electrónica, respectivamente.

En la figura 6.24, se presenta el perfil para la reacción PEST. Nótese que después de la transferencia electrónica vertical, aunque se aprecia una disminución de la densidad de espín sobre el Trp, no desaparece completamente. Sin embargo, la densidad de espín sobre el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ cambia a la distribución característica del ${}^3\text{O}_2$, como la que se observa en el complejo de productos $[\text{Trp}\cdots{}^3\text{O}_2]$. El análisis de cargas NPA y espín de Hirshfeld para la transferencia electrónica vertical, confirmó el proceso de transferencia electrónica. Intentos de calcular el mecanismo PEST en pentil-etanoato, no fueron exitosos, lo que indica que probablemente la reacción entre los radicales $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y HOO^{\bullet} no ocurre en medio lipídico.

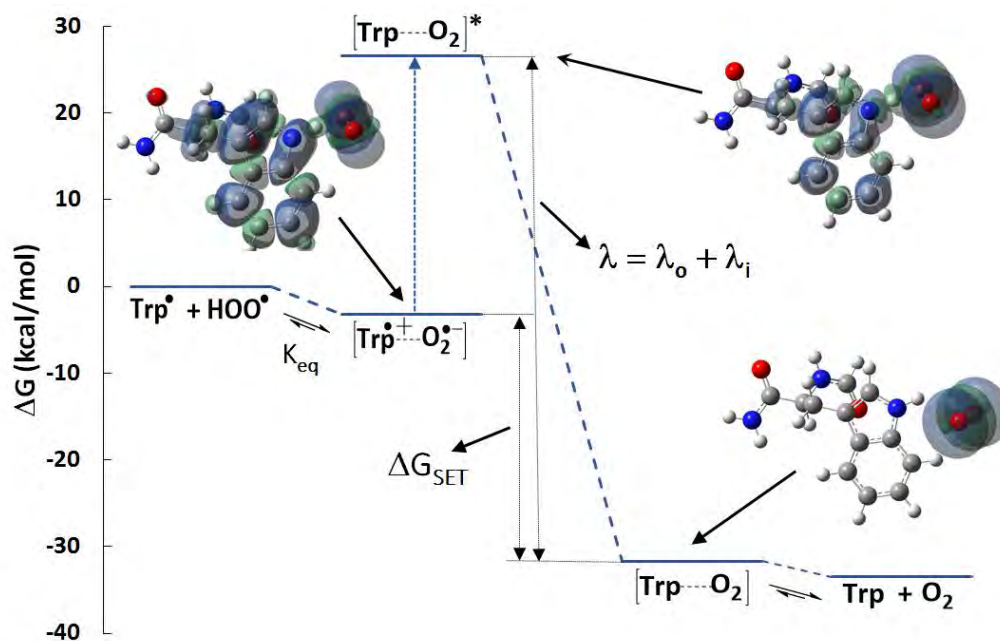


Figura 6.24. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por HOO^{\bullet} a través del mecanismo de reacción PEST. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

6.6.2.2. Reparación de Trp por el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

Sumado al mecanismo PEST, se ha determinado que el catión radical $Trp^{\bullet+}$ y el anión radical $O_2^{\bullet-}$ pueden reaccionar a través de un mecanismo SPGET, i.e., $\Delta G_{rx} = -36.54$ kcal/mol, tabla 6.17 La formación del complejo de transferencia electrónica se encuentra altamente favorecido, $K_{eq} = 2.93 \times 10^4 M^{-1}$, y una vez se forma el complejo, la etapa SET ocurre rápidamente, i.e., $\Delta G_{SET}^\ddagger = 3.52$ kcal/mol. El perfil de reacción se presenta en el apéndice A3, y en la sección 6.6.3 se presentan los parámetros utilizados para el cálculo de ΔG_{SET}^\ddagger .

Finalmente, el análisis de viabilidad termodinámica indican que, el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ puede ser reparado por el anión radical $O_2^{\bullet-}$ a través de un proceso de transferencia electrónica. Esos resultados, concuerdan con los valores de potenciales de reducción de las especies reaccionando, i.e., 0.56 V (pH = 13) y -0.18 V (pH = 7) vs. NHE para los radicales $Trp_{(-H)}^\bullet$ y $O_2^{\bullet-}$, respectivamente. Es importante notar que, de todas las especies reparadoras estudiadas, el único que tiene la capacidad de reparar el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ a través de un mecanismo de transferencia electrónica, es el anión radical $O_2^{\bullet-}$, lo que demuestra una capacidad reductora excepcional.

6.6.3. Cinética de la reparación de triptófano por el anión radical superóxido ($H_nO_2^{\bullet q}$).

En la tabla 6.18, se presentan los resultados del análisis cinético para las reacciones de reparación de los radicales de Trp por el $H_nO_2^{\bullet q}$. La reacción entre el radical neutro $Trp_{(-H)}^\bullet$ y el radical HOO^\bullet , ocurre a través de un mecanismo PEST con una energía de activación muy baja ($\Delta G_{PEST}^\ddagger = 0.6$ kcal/mol), y contribuye con el 3.16% al valor de k_{total} a pH fisiológico. La reacción entre el radical $Trp_{(-H)}^\bullet$ y el anión radical $O_2^{\bullet-}$ ocurre a través de un mecanismo SET a velocidades cercanas al límite por difusión ($k_{SET} = 7.27 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$), reacción que contribuye con el 94.44% al valor de k_{total} a pH = 7.4. La reparación del catión radical $Trp^{\bullet+}$ es mediada por el anión radical $O_2^{\bullet-}$, ocurre sin barrera a través del mecanismo SPGET y contribuye con el 2.40% al valor de k_{total} a pH fisiológico. Los valores necesarios para el cálculo de las energías de activación de las etapas elementales SET en los mecanismos PEST y SPGET, se presentan en la tabla 6.19. Los valores de ΔG_{SET} y ΔG_{SET}^\ddagger demuestran que, una vez se alcanza la geometría del complejo $[Trp^{\bullet+} \cdots O_2^{\bullet-}]$, la transferencia electrónica ocurre rápidamente y de forma irreversible. Nótese que la formación del complejo $[Trp^{\bullet+} \cdots O_2^{\bullet-}]$ se encuentra favorecida para los dos mecanismos, i.e., $K_{eq} = 2.23 \times 10^2 M^{-1}$ para PEST y $K_{eq} = 3.93 \times 10^4 M^{-1}$ para SPGET. La constante de velocidad total k_{total} , a pH = 7, es $7.66 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, valor 2.4 veces más pequeño que la constante de velocidad reportada experimentalmente ($k_{exp} = 2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ a

pH = 7).^[169] La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 0.57 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

Tabla 6.18. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación de los radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{O}_2^{\text{q}}$.

| Radical | $\text{H}_n\text{O}_2^{\text{q}}$ | Mecanismo ^[a] | ΔG^\ddagger [b] | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|----------|
| Trp _(-H) [•] | HO_2^{\bullet} | PEST | 0.60 | 2.47×10^7 | 3.16 |
| | $\text{O}_2^{\bullet-}$ | SET | 5.36 | 7.27×10^8 | 94.44 |
| Trp ^{•+} | $\text{O}_2^{\bullet-}$ | SPGET | 0.00 | 1.84×10^7 | 2.40 |
| | | | | k_{total} | 100 |

Tabla 6.19. Datos relevantes para la reacción SET intramolecular en los mecanismos PEST y SPGET, calculados a 298.15 K, para la reparación de Trp por $\text{H}_n\text{O}_2^{\text{q}}$.

| Radical | $\text{H}_n\text{O}_2^{\text{q}}$ | Mecanismo | K_{eq} ^[b] | ΔG_{SET} ^[c] | λ_i ^[d] | λ_o ^[e] | $\Delta G^\ddagger_{\text{SET}}$ ^[f] | k_{SET} |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|
| Trp _(-H) [•] | HO_2^{\bullet} | PEST | 2.23×10^2 | -28.50 | 42.26 | 14.51 | 3.80 | 4.95×10^9 |
| Trp ^{•+} | $\text{O}_2^{\bullet-}$ | SPGET | 3.93×10^4 | -28.50 | 42.26 | 16.00 | 3.52 | 5.90×10^9 |

^[a] Constantes de equilibrio (M^{-1}); ^[b] energías libres de reacción (kcal/mol); ^[c] energías de reorganización interna (kcal/mol); ^[d] energías de reorganización del solvente (kcal/mol); ^[e] energías libres de activación (kcal/mol); y ^[f] constantes de velocidad SET (s^{-1}).

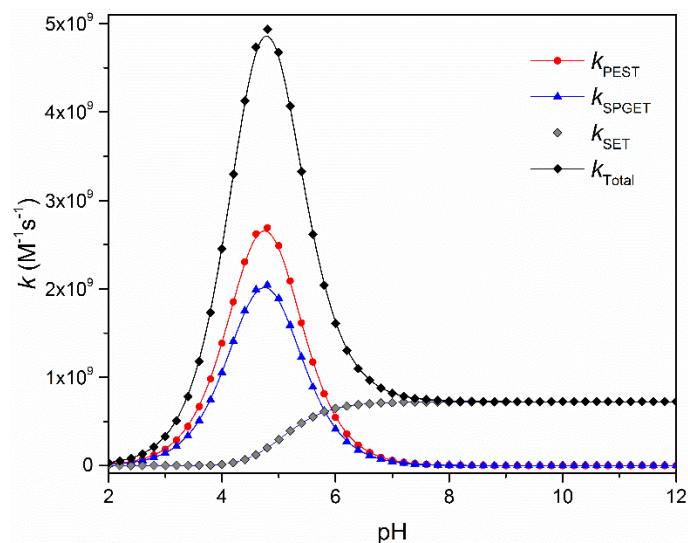


Figura 6.25. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para los mecanismos PCET y SET, para la reparación de radicales de Trp por el $\text{H}_n\text{O}_2^{\text{q}}$.

En la figura 6.25, se presenta el perfil de variación para las k de velocidad en función del pH. Es evidente que los mecanismos PEST y SPGET cobran importancia a valores de pH inferiores al fisiológico. Alrededor de un valor de pH de 6, los tres mecanismos (PEST, SPGET y SET) contribuyen, aproximadamente, de la misma forma al valor de k_{total} , y a valores de pH inferiores, las principales contribuciones provienen de los mecanismos secuenciales PEST y SPGET.

6.7. Reparación de tirosina por el ácido úrico (H_nUr^q).

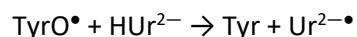
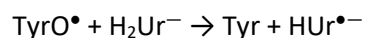
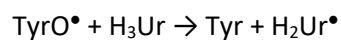
6.7.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y ácido úrico (H_nUr^q).

En tabla 6.20, se presentan los datos de viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación por el H_nUr^q . Debido a las propiedades ácido-base del H_nUr^q , existen siete posibles reacciones FHT, de las cuales cinco son exergónicas. Adicionalmente, la reacción con la fracción di-aniónica HUr^{2-} comprende un caso interesante de estudio, razón por la cual se ha determinado la viabilidad termodinámica de las tres reacciones posibles con el radical TyrO^\bullet , i.e., las reacciones FHT con los sitios NH 2 y 3, y una reacción SET. Las tres reacciones FHT presentan valores exergónicos, y, por lo tanto, han sido consideradas en el análisis termodinámico y cinético. Nótese que, de las tres reacciones SET consideradas, la única que mostro ser viable es aquella en la que participa la fracción di-aniónica HUr^{2-} .

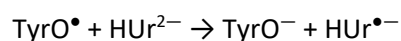
Tabla 6.20. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación del radical TyrO^\bullet por el H_nUr^q .

| Reacción | Reparador | NH | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|-------------------------|------|------------------------|------------------------|
| FHT | H_3Ur | 1 | -1.94 | -2.14 |
| | | 2 | -1.67 | -1.72 |
| | | 3 | -0.99 | -1.19 |
| | | 4 | 10.23 | 10.08 |
| | H_2Ur^- | 2 | -2.85 | -2.94 |
| | | 3 | -7.80 | -7.96 |
| | HUr^{2-} | 3 | -9.17 | -9.80 |
| | | 4 | -1.83 | -2.18 |
| SET | H_3Ur | ---- | 29.46 | 29.09 |
| | H_2Ur^- | ---- | 12.87 | 12.59 |
| | HUr^{2-} | ---- | -0.56 | -1.17 |

Por lo tanto, las reacciones a través de las cuales se puede presentar algún tipo de actividad reparadora son:



las cuales corresponden a reacciones FHT, y la reacción SET:



En comparación al radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$, el radical TyrO^\bullet experimenta una disminución más importante de la aromaticidad debido a la formación de un enlace C-O con carácter sp^2 . Por lo tanto, al restaurarse el enlace sp^3 C-OH, el proceso se ve favorecido entrópicamente, i.e., el enlace C-O sp^2 pasa a un enlace sp^3 que da origen a una torsión alrededor del enlace C-O (C-C—O-H), proceso que implica un aumento de la entropía vibracional ($T \cdot \Delta S_{\text{vib}} = 0.59$ kcal/mol). En este caso, los efectos entrópicos negativos son impuestos por la especie reparadora, consecuencia de la pérdida de grados de libertad vibracional por la transferencia de un átomo de hidrógeno, y el aumento de la rigidez en el heterociclo debido al proceso de deslocalización electrónica del radical libre.

Al igual que los sistemas discutidos anteriormente, la principal fuerza impulsora de la reacción corresponde a la entalpía, i.e., el enlace O-H en la Tyr es 1.1-8.9 kcal/mol más fuerte que los enlaces N-H que se rompen en la especie reparadora.

En la tabla 6.21 se muestran los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para la reparación del radical TyrO^\bullet por H_3Ur en pentiletanoato. A diferencia de la termoquímica en medio acuoso, donde tres posiciones mostraron ser reactivas, sólo los sitios NH 1 y 2 presentan valores de ΔG_{rx} favorables. Para este sistema, la reacción con el NH 1 es -0.13 kcal/mol más favorable en medio acuoso, y la reacción con el NH 2 es -0.37 kcal/mol más favorable en medio lipídico.

Al igual que la reparación de $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ por H_3Ur en medio lipídico, el grupo NH 2 corresponde a la posición con el valor de ΔG_{rx} más favorable, consecuencia de la polaridad del radical formado sobre la posición NH 2, la cual es menor en comparación al radical formado sobre la posición NH 1. Los efectos entrópicos son despreciables y la variación de entalpía es la fuerza motriz de la reacción.

Tabla 6.21. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de TyrO• por H₃Ur en pentiletanoato.

| Reparador | NH | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|-------------------|----|-----------------|-----------------|
| H ₃ Ur | 1 | -2.12 | -2.17 |
| | 2 | -2.39 | -2.33 |
| | 3 | 1.22 | 1.11 |
| | 4 | 16.41 | 16.55 |

6.7.2. Mecanismos de reparación de radicales de Tyr por el ácido úrico (H_nUr^q).

De acuerdo con los datos de viabilidad termodinámica presentados en la tabla 6.20, siete reacciones FHT y una reacción SET, son viables termodinámicamente en medio acuoso. A continuación, se presentan los resultados del análisis mecanístico para esas reacciones.

6.7.2.1. Reparación de Tyr por la fracción completamente protonada del ácido úrico (H₃Ur).

El valor de pK_a del radical TyrO• protonado es negativo (~ -2.0),^[189] lo que descarta la posibilidad de un intercambio de H⁺ con cualquiera de las dos fracciones de H_nUr^q consideradas. Los potenciales de reducción (NHE) del H₃Ur (pH = 0) y TyrO• (pH = 7) son 0.99 y 0.94 V,^[92,152,190] por lo que es improbable que dichas especies reaccionen a través de un mecanismo EPST, para el cual la primera etapa corresponde a una reacción SET (el valor calculado en este trabajo para $\Delta G_{SET} = 29.46$ kcal/mol). Por lo tanto, la única posibilidad es que la reacción ocurra por un mecanismo concertado HAT o PCET. Para este sistema, sólo fue posible localizar un TS, el asociado a la reacción con el sitio NH 3 del H₃Ur. El hecho de no haber localizado los TS para las posiciones NH 1 y 2, puede estar relacionado con la tendencia de esas posiciones de reaccionar a través de un mecanismo PEST, i.e., al parecer esas posiciones son malas donadoras de átomo de hidrógeno debido a la acidez que presentan. Sin embargo, como ya se mencionó, las propiedades ácido-base del radical TyrO• impiden que reaccione a través de un mecanismo que implique la formación del catión radical TyrOH*•.

En la figura 6.26 se presentan los resultados del análisis mecanístico para la reacción entre el radical TyrO• y el sitio de reacción NH 3 del H₃Ur. La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.008-0.010, valores que corresponde a un H⁺. La carga y densidad de espín sobre el aceptor y donador se invierte durante la transferencia del H⁺, característica que indica que el H⁺ y el e⁻ se transfieren en una sola etapa de reacción. Los orbitales HOMO y SOMO, a la geometría del TS, se encuentran deslocalizados sobre el donador y aceptor. Por lo tanto, el resultado indica que la

reparación ocurre a través de un mecanismo de reacción PCET. La inversión de la densidad de espín entre el donador y aceptor, ocurre un poco antes del TS, indicando que existe una ligera asincronía en la dirección del EPST.

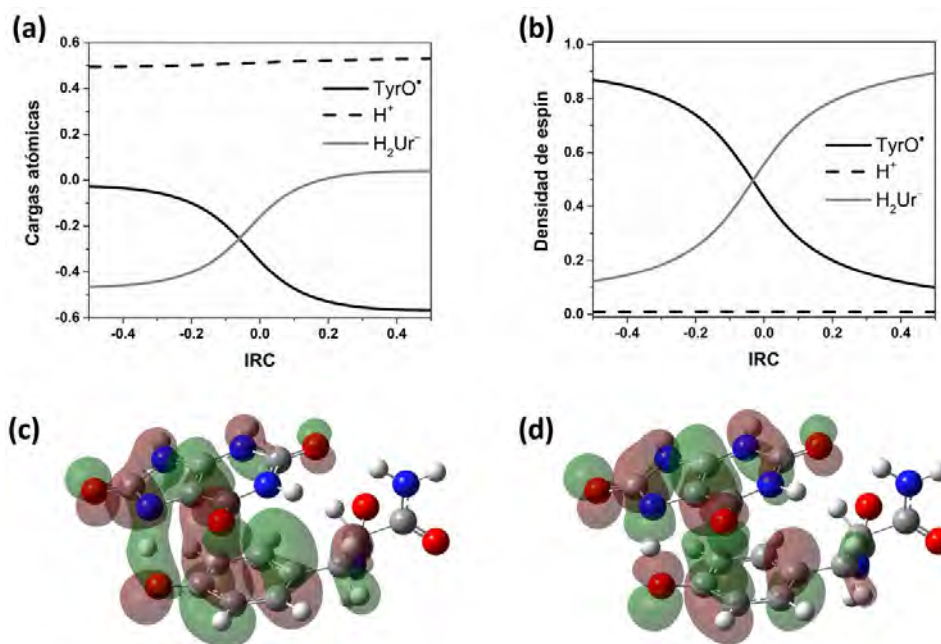


Figura 6.26. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y H₃Ur (NH 3). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

6.7.2.2. Reparación de Tyr por la fracción mono-aniónica del ácido úrico (H₂Ur⁻).

La reacción entre TyrO• y H₂Ur⁻ puede ocurrir a través de tres mecanismos, uno secuencial (EPST) y dos concertados (HAT y PCET). El potencial de reducción del H₂Ur⁻ (pH = 7) es 0.51 V vs. NHE,^[152] lo que indica que la etapa SET para un mecanismo EPST es viable. Sin embargo, el valor de ΔG_{SET} calculado (12.87 kcal/mol) se encuentra en contradicción con lo esperado desde los potenciales redox de los reactivos.

Para la reacción entre el radical TyrO• y el sitio NH 2 del H₂Ur⁻, se calculó un complejo de transferencia electrónica, en el que se incluyeron dos moléculas explícitas de agua, figura 6.27. Una vez el sistema alcanza la geometría del complejo, ocurre la transferencia electrónica vertical, seguida de una etapa de relajación vibracional que involucra la transferencia de un H⁺ desde el radical H₂Ur• (pK_a = 3.1)^[152] al anión TyrO⁻ (pK_a ~ 10).^[191] Este mecanismo no puede ser clasificado como EPST, porque no existe un intermediario estable después del proceso de transferencia

electrónica y antes de la transferencia del H^+ , i.e., la transferencia del e^- y H^+ ocurre en una sola etapa. Por lo tanto, el mecanismo debe ser clasificado como PCET con un alto grado de asincronía entre la transferencia de las partículas que conforman el H^\bullet . En la figura 6.27 se presenta el perfil de reacción. La energía de activación ha sido calculada utilizando la teoría de Marcus,^[141-143] donde la energía de reorganización interna (λ_i) incluye la contribución asociada a la transferencia del H^+ . La energía libre de activación del proceso es $\Delta G^\ddagger = 7.21$ kcal/mol. Es importante comentar que, como se verá en la sección 6.7.3, la reacción PCET presentada en la figura 6.27, es la única que puede explicar las observaciones experimentales reportadas en la literatura, razón por la cual se realizó la búsqueda del complejo de transferencia electrónica. La búsqueda de complejos similares para otros sistemas, no fue exitosa.

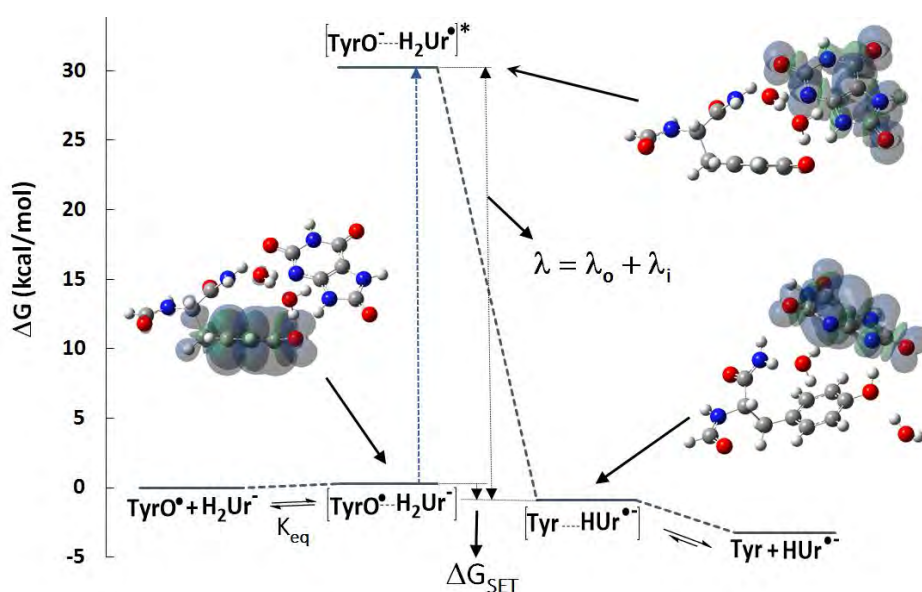


Figura 6.27. Perfil de reacción para la reparación del radical $TyrO^\bullet$ por H_2Ur^- (NH 2) a través del mecanismo PCET. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

La reacción entre $TyrO^\bullet$ y el sitio NH 3 del H_2Ur^- ocurre a través de un mecanismo PCET (figura 6.28). La carga NPA y densidad de espín Hirshfeld sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y $0.006-0.010$, respectivamente. La inversión de la densidad de espín entre donador y aceptor ocurre antes de alcanzar la geometría del TS, i.e., la transferencia del H^+ y e^- es asincrónica en la dirección de EPST. Finalmente, los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados a la geometría del TS, en los que se observa la existencia de interacciones $\pi-\pi$ *stacking* que abren un canal de transferencia electrónica.

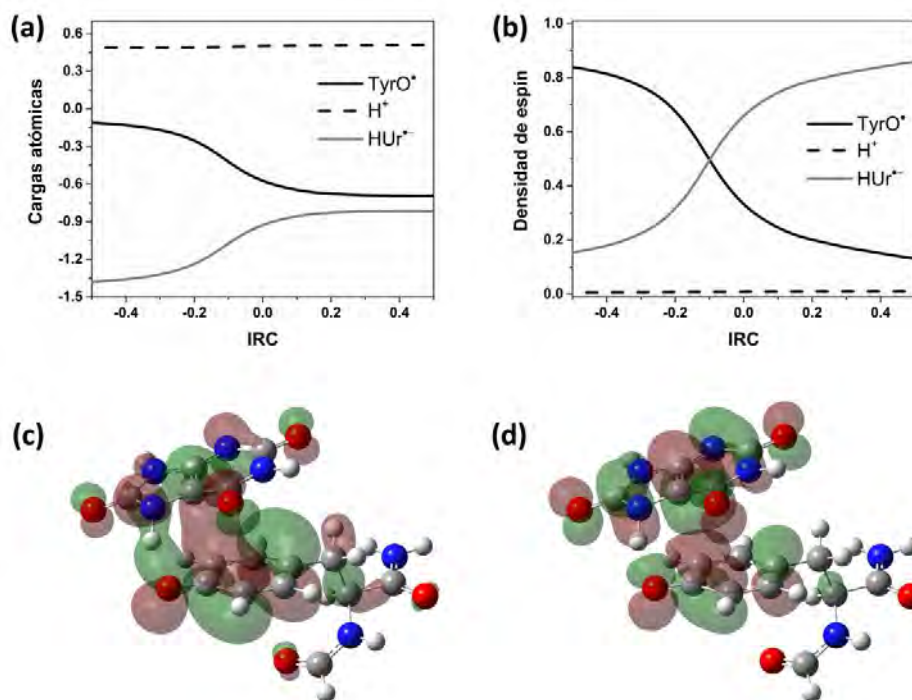


Figura 6.28. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y H₂Ur⁻ (NH₃). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

6.7.2.3. Reparación de Tyr por la fracción di-aniónica del ácido úrico (HUr²⁻).

En la figura 6.29 se presentan los resultados del análisis de evolución de cargas NPA y espín de Hirshfeld en función de la coordenada intrínseca de reacción. La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son ~0.5e y 0.007-0.011, respectivamente, valores característicos de un H⁺. La densidad de espín se encuentra localizada sobre el donador, lo que indica que el e⁻ ha sido transferido en una etapa previa a la transferencia de H⁺, i.e., el mecanismo de reacción es EPST.

Un análisis detallado de la superficie de energía potencial calculada para el TS, indican que el total de la superficie corresponde a una superficie de transferencia de H⁺, y no se observan regiones asociadas a la etapa SET. Por lo tanto, la etapa SET debe ocurrir sin barrera y de forma irreversible. Los potenciales de reducción de las especies reaccionando indican que la reacción SET debe estar altamente favorecida, i.e., para el HUr²⁻ y TyrO•, E₀' vs. NHE es 0.26 V (pH = 13) y 0.94 V (pH = 7).^[152,190] Los orbitales HOMO y SOMO se encuentran localizados sobre el aceptor y donador, respectivamente, comportamiento que confirma el mecanismo EPST.

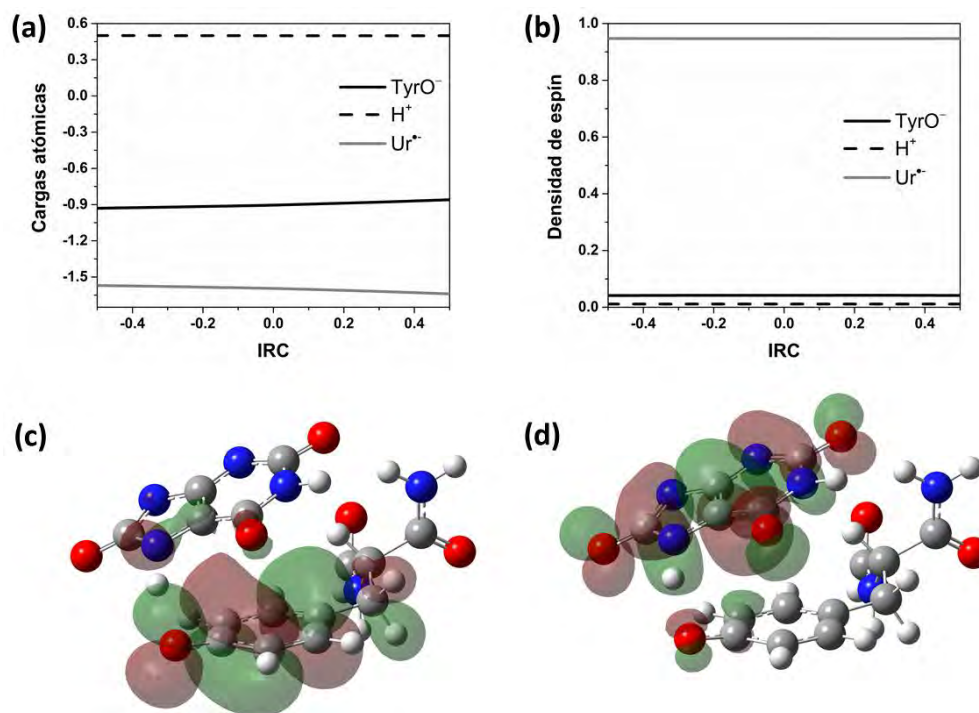


Figura 6.29. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y HUr²⁻ (NH 3). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

Las observaciones asociadas al mecanismo EPST, permitió establecer las bases necesarias para realizar el análisis cinético de la reacción SET, $\text{TyrO}^\bullet + \text{HUr}^{2-} \rightarrow \text{TyrO}^- + \text{HUr}^{\bullet-}$. Si la reacción ocurre sin barrera, la constante de velocidad asociada a tal reacción, debe corresponder a la constante de difusión corregida para la concentración de reactivos al pH de interés, i.e, $k_{\text{SET}} = mf(\text{TyrO}^\bullet) \cdot mf(\text{HUr}^{2-}) \cdot k_{\text{D}}$, donde $mf(\text{TyrO}^\bullet)$ y $mf(\text{HUr}^{2-})$ son las fracciones molares de los reactivos y k_{D} es la constante de difusión en medio acuoso.

6.7.3. Cinética de la reparación de tirosina por ácido úrico (H_nUr^q).

En la tabla 6.22 se presentan los resultados del análisis cinético para las reacciones de reparación del radical TyrO• por el H_nUr^q. La reacción de reparación con el sitio NH 3 del H₃Ur presenta un valor de ΔG^\ddagger relativamente alto, razón por la cual la constante de velocidad no contribuye al valor de k_{total} . Las reacciones con los sitios NH 2 y 3 del H₂Ur contribuyen con el 92.33 y 0.44 % al valor de k_{total} . Por lo tanto, la reacción con el NH 2 de la fracción H₂Ur⁻ corresponde a la vía principal de reparación de Tyr por H_nUr^q.

Tabla 6.22. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación del radical TyrO \cdot por el H_nUr^q .

| H_nUr^q | NH | Mecanismo | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|-------------------------|-------|-----------|---------------------|-----------------------|----------|
| H_3Ur | 3 | PCET | 17.30 | 5.75×10^0 | 0.00 |
| H_2Ur^- | 2 | PCET | 6.92 | 5.13×10^7 | 90.25 |
| | 3 | PCET | 10.56 | 2.42×10^5 | 0.43 |
| HUr^{2-} | 3 | EPST | 2.20 | 2.45×10^6 | 4.31 |
| | 4 | EPST | 5.24 | 2.75×10^5 | 0.48 |
| | ----- | SET | 0.00 | 2.57×10^6 | 4.52 |
| | | | k_{total} | 5.55×10^7 | 100 |

El análisis cinético de la reacción con el sitio NH 2 del H_2Ur^- , se realizó con base en la teoría de Marcus.^[141-143] La energía de reorganización interna ($\lambda_i = 22.45$ kcal/mol) incluye la contribución energética asociada a la transferencia de un H^+ desde el donador hacia el aceptor, figura 6.27, y la energía de reorganización del solvente es $\lambda_o = 6.43$ kcal/mol. Para la reacción $[\text{TyrO}\cdot \cdots \text{H}_2\text{Ur}^-] \rightarrow [\text{Tyr} \cdots \text{HUr}\cdot^-]$, la energía libre de reacción es $\Delta G = -1.18$. Esos valores de λ_i , λ_o y ΔG , producen un valor de $\Delta G^\ddagger = 6.92$ kcal/mol.

Para la reacción con el sitio NH 3 del H_2Ur^- , se localizó un TS con una energía libre de activación de 10.56 kcal/mol, valor que se reemplazó directamente en la ecuación de la teoría convencional de estado de transición.

Las reacciones FHT con la fracción di-aniónica presentan las barreras de activación más baja para ese tipo de reacciones, y ocurren a través de un mecanismo EPST. La energía de activación se calculó como la diferencia entre la energía de los TS y los reactivos, es decir, se ha considerado que la etapa elemental SET ocurre sin barrera. El pK_a del anión radical $\text{HUr}\cdot^-$ es 9.5,^[152] por lo tanto, la transferencia de un H^+ en una segunda etapa elemental es razonable, i.e., el pK_a del anión TyrO $^-$ es ~ 10 .^[191] Las constantes de velocidad a pH fisiológico son del orden de $\sim 10^6$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $\sim 10^5$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y contribuyen con un 4.78 % a la k_{total} . Por lo tanto, la participación de la fracción HUr^{2-} en el proceso de reparación de Tyr, no debe ser ignorada.

Finalmente, de acuerdo al comportamiento observado para las reacciones EPST, se ha asumido que la reacción SET ocurre sin barrera, i.e., los reactivos deben formar un complejo de reactivos en el

cual la reacción SET ocurre sin barrera. Asumir esto es justificable al observar que, las superficies de energía potencial de las reacciones EPST no presentan ninguna región de transferencia electrónica, de modo que el total de la superficie corresponde a una transferencia de H^+ entre el anión $TyrO^-$ y el anión radical $HUr^{\bullet-}$, i.e., la reacción SET debe ocurrir en una etapa previa a la transferencia de H^+ y es irreversible. Por tal razón, no fue posible calcular un complejo para la reacción SET y la constante de velocidad corresponde a la constante de difusión (calculada utilizando como distancia de reacción, la suma de los radios efectivos para las especies reaccionando) corregida para las concentraciones de reactivos a pH fisiológico. Bajo los anteriores supuestos, la constante de velocidad SET contribuye con el 4.5 % a la k_{total} , contribución que no debe ser ignorada.

La variación de las constantes de velocidad en función del pH (figura 6.30), para la reparación del radical $TyrO^{\bullet}$ por cada fracción del H_nUr^q , es muy diferente a los comportamientos discutidos hasta este punto. Para este caso particular, las constantes de velocidad se presentan para cada fracción del H_nUr^q , donde la constante asociada a una determinada fracción, es la suma de todas las reacciones propuestas para esa fracción, tabla 6.22

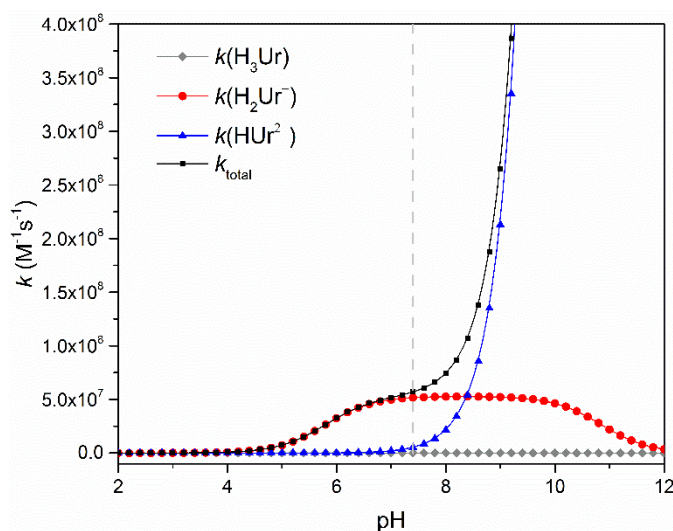


Figura 6.30. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical $TyrO^{\bullet}$ por cada fracción del H_nUr^q .

La contribución a la reparación por la fracción H_3Ur es muy baja a todos los valores de pH. La constante de velocidad para la reacción con la fracción H_2Ur^- , permanece constante en la región de $pH = 7$ a 9.8 , fuera de ese rango, la constante de velocidad disminuye. Para las reacciones con HUr^{2-} , la constante de velocidad aumenta rápidamente a valores de pH mayores que el fisiológico, con

un límite superior del orden de $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que corresponde al límite por difusión. A $\text{pH} = 9.4$, la constante de velocidad relacionada a las reacciones con la fracción HUr^{2-} , es aproximadamente un orden de magnitud mayor que la constante asociada a la fracción H_2Ur^- , i.e., $k(\text{H}_2\text{Ur}^-) = 5.11 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k(\text{HUr}^{2-}) = 5.24 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Nótese que en el rango de valores de pH de 4.6 a 6.8, la contribución mayoritaria a la k_{total} , proviene de la fracción H_2Ur^- .

El valor de k_{total} ($5.55 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) es 5.4 veces menor que el valor reportado experimentalmente para la reparación del radical TyrO^\bullet a pH fisiológico ($k_{\text{exp}} = 3.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en pepsina),^[26,27] resultado que valida la metodología utilizada. La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 1.0 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

6.8. Reparación de tirosina por el ácido ascórbico (H_nAsc^q).

6.8.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y ácido ascórbico (H_nAsc^q).

En la tabla 6.23, se presenta la termoquímica de las reacciones de reparación de TyrO^\bullet por las fracciones de H_nAsc^q . De los caminos de reacción considerados, únicamente la FHT mostró ser exergónica. Esto indica que, la actividad reparadora a pH fisiológico puede ser explicada exclusivamente por la reacción FHT desde la fracción HAsc^- al radical TyrO^\bullet . Sin embargo, como se discutió en la sección 6.1.1, a pH inferiores a 7.4, la fracción H_2Asc puede ser importante, razón por la cual ha sido considerada.

Tabla 6.23. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación del radical TyrO^\bullet por H_nAsc^q .

| Reacción | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|----------------------------------|------------------------|------------------------|
| | H_2Asc (sitio 1) | -6.29 | -6.73 |
| FHT | H_2Asc (sitio 2) | -4.79 | -5.17 |
| | HAsc^- | -16.26 | -16.92 |
| SET | H_2Asc | 36.56 | 35.74 |
| | HAsc^- | 9.30 | 8.44 |

Todas las reacciones FHT son favorables en términos de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} , especialmente para la fracción HAsc^- . Los efectos entrópicos para la reparación con H_2Asc y HAsc^- son desfavorables ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} < 0$), consecuencia de la variación en la entropía vibracional de las especies reparadoras, i.e., $T \cdot \Delta S_{\text{vib}}$ es -0.62 y -0.66 kcal/mol para la oxidación del sitio OH 1 y 2 del H_2Asc , respectivamente, y -0.58 kcal/mol para la oxidación del mono-anión HAsc^- .

Para las reacciones FHT, el enlace O-H en la Tyr es 5.1 y 6.8 kcal/mol más fuerte que los enlaces OH 1 y OH 2 en la fracción H₂Asc, y 17.2 kcal/mol más fuerte que el enlace OH 2 en la fracción HAsc⁻, por lo tanto, la fuerza motora de las reacciones de reparación corresponde a la entalpía.

Las dos reacciones SET consideradas, son altamente endergónicas, lo que permite descartar su participación en los procesos de reparación de los radicales de Tyr por el H_nAsc^q.

En la tabla 6.24 se presentan los datos de viabilidad termodinámica para la reparación del radical TyrO• por H₂Asc en pentiletanoato. La reacción para la posición OH 1, es -0.70 kcal/mol más favorable en medio lipídico en comparación en medio acuoso. De forma contraria, para la posición OH 2, la reacción es 0.40 kcal/mol menos exergónica en comparación al medio acuoso. Esa tendencia es consecuencia de la variación del momento dipolar en el reparador, i.e., la magnitud de los momentos dipolares del H₂Asc y los radicales HAsc• (sitios OH 1 y 2) son 3.17, 2.41 y 5.11 D, respectivamente.

Tabla 6.24. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de TyrO• por H₂Asc en pentiletanoato.

| Reparador | OH | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|--------------------|----|-----------------|-----------------|
| H ₂ Asc | 1 | -6.99 | -7.15 |
| | 2 | -4.38 | -4.40 |

Los efectos entrópicos desfavorecen ligeramente la reacción con la posición OH 1 (-0.16 kcal/mol) y son despreciables para la reacción con la posición OH 2 (-0.02 kcal/mol). Al igual que todos los sistemas discutidos hasta el momento, la entalpía corresponde a la fuerza impulsora del proceso de reparación.

6.8.2. Mecanismos de reparación de radicales de Tyr por el ácido ascórbico (H_nAsc^q).

Tres reacciones FHT son viables termodinámicamente, dos con la fracción H₂Asc (sitio OH 1 y 2) y una con la fracción HAsc⁻. Para la fracción H₂Asc, el valor de pK_a (4.2)^[155] y potencial de reducción (0.99 V a pH = 0),^[92] permiten descartar la posibilidad de que la reparación ocurra a través de los caminos de reacción secuenciales PEST y EPST. Por lo tanto, los mecanismos de reparación probables corresponden a los mecanismos concertados HAT y PCET. Con respecto a la fracción HAsc⁻, el potencial de reducción (0.30 V a pH = 7)^[92] indica que la reparación podría ocurrir a través de una reacción SET. Sin embargo, el valor de ΔG_{SET} calculado demostró que la reacción SET es endergónica (9.30 kcal/mol), lo que descarta la posibilidad de una reacción secuencial EPST. Por lo

tanto, de la misma forma que para el H_2Asc , la vía de reacción más probable corresponde a un mecanismo concertado HAT o PCET. Para las tres reacciones se pudieron localizar los TS y a continuación se discute el análisis mecanístico.

6.8.2.1. Reparación de Tyr por la fracción completamente protonada del ácido ascórbico (H_2Asc).

En la figura 6.31 se muestra el perfil de variación de cargas NPA y densidad de espín de Hirshfeld en función de la coordenada de reacción (sitio OH 1). La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son ~ 0.6 e $0.005\text{-}0.007$, respectivamente, i.e., el núcleo se transfiere como un H^+ . Se observa una inversión de la carga y densidad de espín entre el aceptor y donador, lo que indica que el e^- se transfiere de forma simultánea con el H^+ , comportamiento típico de un mecanismo PCET. Finalmente, los orbitales HOMO y SOMO revelan la existencia de interacciones π - π *stacking* a la geometría del TS, interacciones que abren el canal de transferencia electrónica para el mecanismo PCET. La reacción con el sitio OH 2, presenta un comportamiento análogo al discutido para el sitio de reacción OH 1.

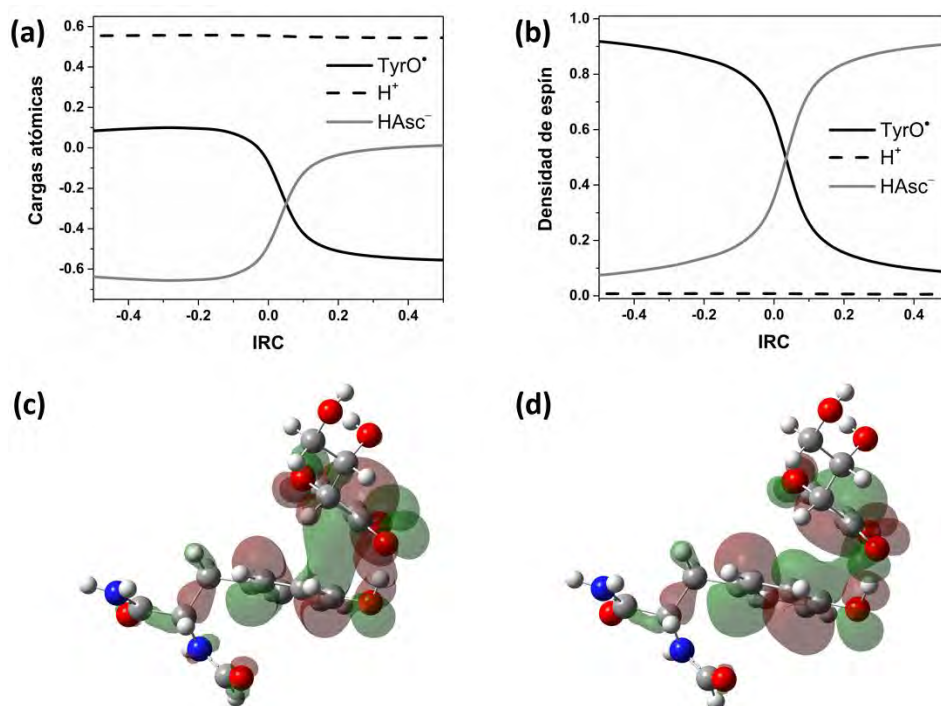


Figura 6.31. Reacción de reparación entre el radical TyrO^\bullet y H_2Asc (OH 1). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

Para este caso, el entrecruzamiento entre las curvas de cargas y espín para el aceptor y donador se encuentra después de la geometría del TS. Dicho comportamiento indica que, la transferencia del e^- se encuentra retrasada con respecto a la transferencia del H^+ en comparación a las reacciones PCET del $Trp_{(-H)}^\bullet$ con H_2Ur^- , HUr^{2-} y $HAsc^-$, y las reacciones de la $TyrO^\bullet$ con H_3Ur y H_2Ur^- , donde la transferencia del H^+ se encuentra retrasada con respecto a la transferencia del e^- , i.e., la reacción presenta una asincrónica en la dirección de PEST.

La reparación de Tyr por la fracción H_2Asc también se estudió en pentiletanoato, encontrándose un comportamiento similar al observado en medio acuoso. La carga sobre el núcleo en transferencia es $\sim 0.5e$ y la densidad de espín es 0.007-0.010, la inversión de la densidad de espín entre el aceptor y donador ocurre después de la geometría del TS, y el sistema presenta interacciones π - π *stacking* a la geometría del TS.

6.8.2.2. Reparación de Tyr por la fracción mono-aniónica del ácido ascórbico ($HAsc^-$).

En la figura 6.32 se presenta la variación de cargas NPA y densidades de espín Hirshfeld para la reacción $TyrO^\bullet + HAsc^-$.

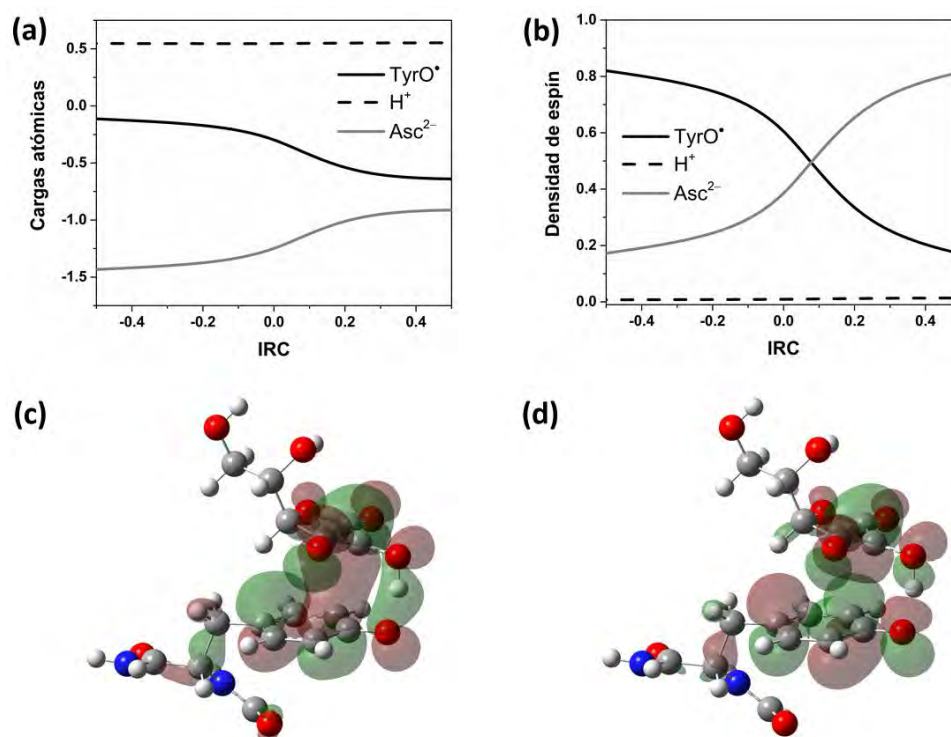


Figura 6.32. Reacción de reparación entre el radical $TyrO^\bullet$ y $HAsc^-$. Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

La carga y densidad de espín sobre el núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y $0.007-0.014$, respectivamente. Se observa una inversión de la densidad de espín entre el aceptor y donador después de la geometría del TS. Y, finalmente, la densidad de los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados a la geometría del TS y revelan la existencia de interacciones $\pi-\pi$ *stacking* (figura 6.32). Los resultados indican, inequívocamente, que la reacción ocurre a través de un mecanismo PCET, donde la asincronía, al igual que la reacción con la fracción H_2Asc , se inclina en la dirección de PEST.

6.8.3. Cinética de la reparación de tirosina por ácido ascórbico (H_nAsc^q).

En la tabla 6.25, se presentan las constantes de velocidad calculadas para la reparación del radical $TyrO^\bullet$ por el H_nAsc^q en medio acuoso. A $pH = 7.4$, la fracción $HAsc^-$ contribuye con el 100% al valor de k_{total} . Por otro lado, la fracción de H_2Asc a pH fisiológico es baja, i.e., 6.31×10^{-4} , y las energías de activación, asociadas a sus reacciones, son relativamente altas. Como consecuencia, las constantes de velocidad son 6 órdenes de magnitud menor en comparación a la constante de velocidad asociada a la fracción $HAsc^-$. A un valor de $pH = 4.7$ (pH en lisosomas),^[185] la constante de velocidad para la reacción del radical $TyrO^\bullet$ con H_2Asc y $HAsc^-$ son 1.64×10^6 y $1.19 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. La constante de velocidad, para la reparación mediada por H_2Asc , incrementa ~ 3 órdenes de magnitud, sin embargo, su contribución al valor de k_{total} sólo cobra importancia a valores de pH muy bajos, figura 6.33. El valor de k_{total} , es ~ 5.7 veces mayor en comparación al valor experimental para la reparación de Tyr en la pepsina, $k_{exp} = 2.6 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$.^[23,27] La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 1.03 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

En la tabla 6.26 se presenta el análisis cinético para la reparación de Tyr por la fracción H_2Asc en medio lipídico. Las energías de activación en pentiletanoato, para las reacciones con los sitios OH 1 y 2, son 2.82 y 0.30 kcal/mol menores en comparación al medio acuoso, respectivamente. La reacción con el sitio OH contribuye con el 81.89 % al valor de k_{total} , y la reacción con el sitio OH 2 contribuye con el 18.11 %. En comparación al medio acuoso, el H_2Asc puede reparar de forma eficiente al radical $TyrO^\bullet$ en medio lipídico, con una $k_{total} = 1.49 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$. El valor calculado para k_{total} es ~ 5.3 veces mayor, en comparación al valor experimental de Tyr en lisozima en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS),^[19] sistema que ha sido utilizado como un modelo de reparación de proteínas en membranas celulares. En este caso, la diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 0.99 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

Tabla 6.25. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación del radical de TyrO $^\bullet$ por el H $_n$ Asc q en medio acuoso.

| H $_n$ Asc q | OH | Mecanismo | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|-----------------|----|-----------|---------------------|-----------------------|----------|
| H $_2$ Asc | 1 | PCET | 9.78 | 1.02×10^3 | 0.00 |
| H $_2$ Asc | 2 | PCET | 8.15 | 4.13×10^3 | 0.00 |
| HAsc $^-$ | 2 | PCET | 0.89 | 1.49×10^9 | 100 |
| | | | k_{total} | 1.49×10^9 | 100 |

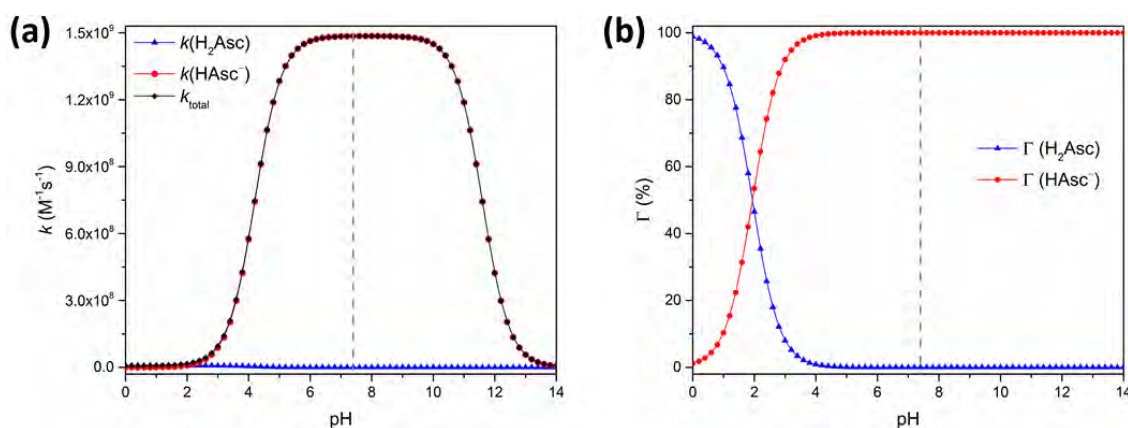


Figura 6.33. Dependencia en el pH para las constantes de velocidad (a) y porcentaje de contribución (b) para los mecanismos PEST, SPGET y PCET, para la reparación del radical de TyrO $^\bullet$ por el H $_n$ Asc q .

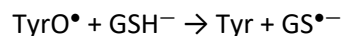
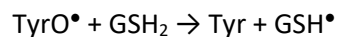
Tabla 6.26. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación del radical TyrO $^\bullet$ por el H $_2$ Asc en pentiletanoato.

| OH | Mecanismo | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|----|-----------|---------------------|-----------------------|----------|
| 1 | PCET | 6.96 | 4.93×10^7 | 81.89 |
| 2 | PCET | 7.85 | 1.09×10^7 | 18.11 |
| | | | k_{total} | 100 |

6.9. Reparación de tirosina por el glutatión (GSH $_n^q$).

6.9.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y glutatión.

En la tabla 6.27, se presenta la termoquímica para las reacciones FHT y SET entre el radical TyrO $^\bullet$ y el GSH $_n^q$. Tres reacciones mostraron ser viables termodinámicamente, las reacciones FHT



y la reacción SET

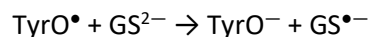


Tabla 6.27. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación del radical TyrO[•] por el GSH_n^q.

| Reacción | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|------------------|-----------------|-----------------|
| FHT | GSH ₂ | -4.37 | -3.30 |
| | GSH ⁻ | -3.27 | -2.95 |
| SET | GSH ₂ | 39.43 | 39.19 |
| | GSH ⁻ | 47.54 | 47.80 |
| | GS ²⁻ | -1.89 | -0.99 |

Es importante notar que, de las reacciones de reparación consideradas entre el radical TyrO[•] y los reparadores H_nUr^q, H_nAsc^q y GSH_n^q, el único que demostró presentar una posible actividad reparadora a través del mecanismo SET, es el di-anión GS²⁻, comportamiento que lo establece como un excelente donador de electrones en comparación a las otras dos especies reparadoras.

Para este caso de estudio, la variación de entropía vibracional de las especies reaccionantes, i.e., TyrO[•] + GSH⁻ para FHT y TyrO[•] + GS²⁻ para SET, favorece la termoquímica de los procesos de reparación, i.e., los valores de $T \cdot \Delta S_{vib}$ son positivos para el proceso de reducción del radical y la oxidación de las tres fracciones del reparador. Sin embargo, la principal fuerza motora de la reacción es la entalpía. El enlace O-H formado, es 4.0 kcal/mol más fuerte que el enlace S-H que se rompe en el GSH⁻.

6.9.2. Mecanismos de reparación de radicales de Tyr por el glutatión (GSH_n^q).

Tres reacciones demostraron ser viables termodinámicamente, las reacciones TyrO[•] + GSH₂ → Tyr + GSH[•] y TyrO[•] + GSH⁻ → Tyr + GS^{•-}, y la reacción TyrO[•] + GS²⁻ → TyrO⁻ + GS^{•-}. Las dos primeras corresponden a reacciones FHT y la segunda a una reacción SET. De acuerdo a los valores de pK_a y potenciales redox para el radical TyrO[•] (-2.0 y 0.94 V a pH = 7)^[93,190] y el GSH⁻ (8.8 y 0.92 V a pH 7.4),^[115,157] se puede esperar que el camino de reacción más probable entre dichas especies sea una

reacción concertada HAT o PCET. Por otro lado, los potenciales redox de las especies reaccionando a través del mecanismo SET, son congruentes con el valor de ΔG_{SET} calculado en este trabajo (-1.89 kcal/mol), i.e., TyrO• y GS²⁻ (0.80 V a pH = 13).^[157] A continuación, se discuten en detalle las tres reacciones de reparación.

6.9.2.1. *Reparación de Tyr por la fracción neutra del glutatión (GSH₂).*

En la figura 6.34 se muestra la evolución de las cargas NPA y densidad de espín de Hirshfeld en función de la coordenada de reacción. De forma similar a la reacción PEST entre el Trp_(-H)• y GSH⁻, la carga del núcleo transferido es ~0.2e al inicio de la región analizada, y aumenta hasta ~0.5e a medida que avanza la reacción, adquiriendo el valor asociado a un H⁺. La densidad de espín para el núcleo transferido varía entre 0.010 y 0.031, donde el valor máximo lo adquiere alrededor de la región donde ocurre el entrecruzamiento de las curvas de densidad de espín entre el aceptor y donador, en la región de productos del IRC. Los orbitales HOMO y SOMO, a la geometría del TS, se encuentran deslocalizados. El comportamiento descrito permite concluir que, la reacción en el radical TyrO• y el GSH₂ ocurre a través de un mecanismo PCET con una asincronía en la dirección de PEST.

6.9.2.2. *Reparación de Tyr por la fracción mono-aniónica del glutatión (GSH⁻).*

En la figura 6.35 se presenta el perfil de variación de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld a lo largo de la coordenada de reacción. De forma similar a la reacción de la fracción GSH₂, la carga del núcleo transferido inicia en ~0.2e y aumenta hasta ~0.5e, la densidad de espín varía entre 0.010 y 0.034, donde el valor máximo se alcanza alrededor de la región de entrecruzamiento de las curvas de densidad de espín del aceptor y donador, finalmente, los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados en la geometría del TS. Por lo tanto, el análisis de cargas, espín y orbitales moleculares, indican que la reacción ocurre a través de un mecanismo PCET con una asincronía en la dirección PEST, i.e., la inversión de la densidad de espín entre el aceptor y donador ocurre después de la geometría del TS. Nótese que la desprotonación del grupo carboxilo del GSH₂ (primera desprotonación), no afecta la reactividad de forma importante ni el mecanismo de reacción, como es de esperarse.

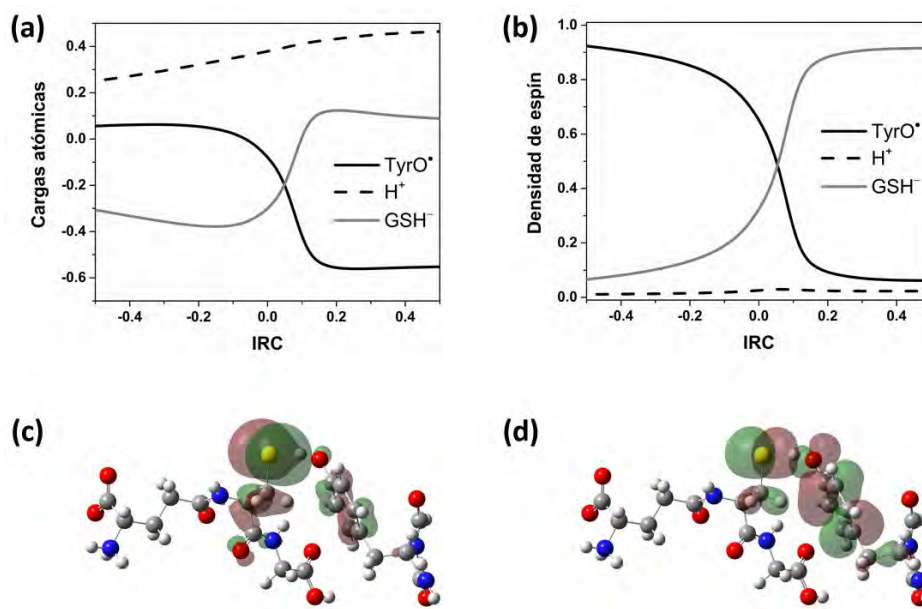


Figura 6.34. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y GSH₂. Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

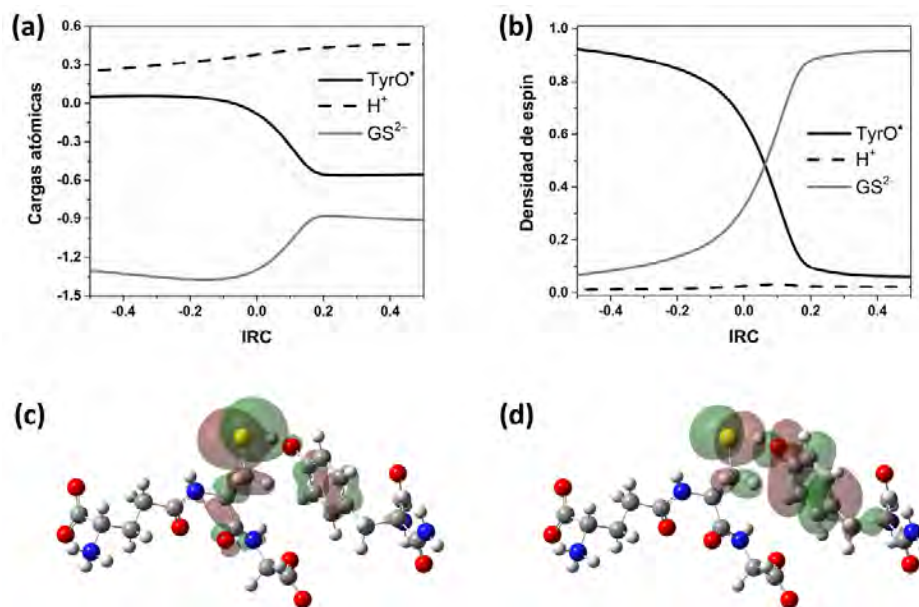


Figura 6.35. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y GSH⁻. Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

6.9.2.3. Reparación de Tyr por la fracción di-aniónica del glutatión (GS^{2-}).

La reacción de reparación SET entre el radical TyrO• y el di-anión GS^{2-} ($\Delta G_{SET} = -1.89$ kcal/mol, tabla 6.27) es viable termodinámicamente. Los potenciales redox para el GS^{2-} y TyrO• son 0.80 V (pH = 13)^[157] y 0.94 V (pH = 7),^[190] respectivamente, valores que concuerdan con una reacción SET exergónica. De forma similar a la reacción SET entre el radical Trp_(-H)• y el anión radical $O_2^{\bullet-}$, no fue posible calcular un complejo de reactivos, razón por la cual la energía de reorganización del solvente (λ_o) se calculó considerando que el radio del complejo de transferencia electrónica, es la suma del radio de los reactivos. En la sección 6.9.3 se presentan los parámetros energéticos, calculados por medio la teoría de Marcus, para la reacción SET entre el radical TyrO• y el di-anión GS^{2-} .

6.9.3. Cinética de la reparación de tirosina por glutatión (GSH_n^q).

En la tabla 6.29 se muestran los resultados del análisis cinético para la reparación de Tyr por GSH_n^q . Las reparaciones por las fracciones GSH_2 y GSH^- , ocurren a través de un mecanismo PCET con energías de activación altas y velocidades bajas, i.e., k_{PCET} son 2.39×10^0 y 2.04×10^3 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. A pH fisiológico, la reacción PCET contribuye únicamente con el 0.02 % al valor de k_{total} .

Tabla 6.28. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(pH=7.4)}$, $M^{-1}s^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación del radical TyrO• por el GSH_n^q .

| GSH_n^q | Mecanismo | ΔG^\ddagger | $k^{(pH=7.4)}$ | Γ |
|-----------|-----------|---------------------|--------------------|----------|
| GSH_2 | PCET | 14.66 | 2.39×10^0 | 0.00 |
| GSH^- | PCET | 15.52 | 2.04×10^3 | 0.02 |
| GS^{2-} | SET | 5.31 | 1.26×10^7 | 99.98 |
| | | k_{total} | 1.27×10^7 | 100 |

Para la reacción SET entre el radical TyrO• y el di-anión GS^{2-} , no fue posible calcular un complejo de reactivos, razón por la cual la energía de reorganización del solvente (λ_o) se calculó considerando que el radio del complejo de transferencia electrónica, es la suma de los radios efectivos de los reactivos. La energía de activación para la reacción SET es relativamente baja, y la constante k_{SET} contribuye con el 99.98 % (pH = 7.4) a la magnitud de k_{total} , lo que indica que la reparación ocurre probablemente a través de un mecanismo SET entre el radical TyrO• y el di-anión GS^{2-} . El valor de k_{total} es ~6.3 veces mayor que la k_{exp} (2.0×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ para la Tyr libre).^[25] La diferencia entre el valor

de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 1.10 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

De forma similar a la reparación de Tyr por $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$, a valores de pH menores al fisiológico, la reparación mediada por GSH_n^{q} no es importante, figura 6.36. Sin embargo, a valores de pH mayores aumenta rápidamente, e.g., la constante k_{SET} es $1.16 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $\text{pH} = 8$ (mitocondria).^[185]

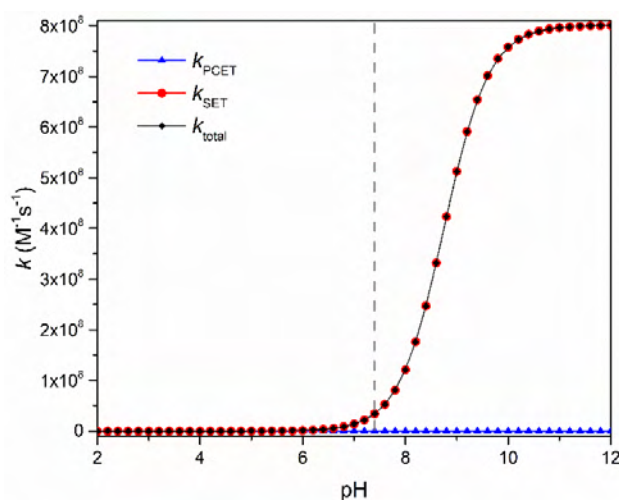
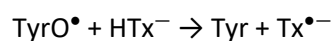
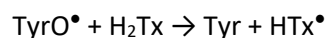


Figura 6.36. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO^{\bullet} por cada fracción del GSH_n^{q} .

6.10. Reparación de tirosina por el trolox ($\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$).

6.10.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y trolox ($\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$).

En la tabla 6.30 se presenta la viabilidad termodinámica de las reacciones FHT y SET entre el radical TyrO^{\bullet} y el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$. Las dos reacciones FHT consideradas, demostraron ser exérgicas, Por otro lado, ninguna reacción SET mostró ser importante para el proceso de reparación de Tyr mediado por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$. Por lo tanto, las reacciones que son importantes para la determinación de los mecanismos de reparación del radical TyrO^{\bullet} son:



Al igual que para la reacción de reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por el $\text{H}_n\text{Tx}^{\text{q}}$, los efectos entrópicos para la reacción FHT asociada al mono-anión HTx^{-} , son favorables ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = 0.86 \text{ kcal/mol}$). Para este caso, la entropía vibracional de los dos reactivos aumenta al pasar de reactivos a productos. Sin

embargo, la fuerza motriz de las reacciones es la variación de entalpía, i.e., la energía del enlace O-H formado en la Tyr, es 8.9 y 11.5 kcal/mol más fuerte en comparación al enlace O-H que se rompe en el H₂Tx y HTx⁻, respectivamente.

Tabla 6.29. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación del radical TyrO• por el H_nTx^q.

| Reacción | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|-------------------|-----------------|-----------------|
| FHT | H ₂ Tx | -8.56 | -8.53 |
| | HTx ⁻ | -11.21 | -10.35 |
| SET | H ₂ Tx | 16.72 | 15.74 |
| | HTx ⁻ | 11.60 | 11.57 |

De la misma forma que la reparación del radical Trp_(-H)•, solo existe una posibilidad para la reacción de reparación entre el radical TyrO• y la fracción H₂Tx en pentiletanoato, i.e., el H₂Tx solo tiene una posición reactiva. La energía libre (ΔG_{rx}) y entalpía (ΔH_{rx}) de reacción son igual a -7.94 y -7.99 kcal/mol. Para este caso particular, la reacción en medio lipídico es 0.62 kcal/mol menos exergónica en comparación al medio acuoso. Diferente a la reparación de Trp, los efectos entrópicos son despreciables ($T \cdot \Delta S_{rx} = -0.05$ kcal/mol). De forma similar a las otras reacciones de reparación discutidas previamente, la fuerza impulsora de la reacción es la variación de entalpía.

6.10.2. Mecanismos de reparación de radicales de Tyr por el trolox (H_nTx^q).

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 6.30, el radical TyrO• puede ser reparado por el H_nTx^q, a través de dos reacciones FHT. Las reacciones SET no son viables termodinámicamente. A continuación, se discuten los detalles mecanísticos de las dos reacciones FHT estudiadas.

6.10.2.1. Reparación de Tyr por la fracción completamente protonada del trolox (H₂Tx).

El valor de pK_a del catión radical de Tyr es ~ -2.0 ,^[93] característica que hace improbable la ocurrencia de un mecanismo de reparación PEST, el cual implique la transferencia de un H⁺ en la primera etapa de reacción. Por otro lado, los potenciales de reducción de los reactivos indican que existe la posibilidad de una reacción de transferencia electrónica (0.89 V a pH = 0 para el H₂Tx, y 0.94 V a pH = 7 para el radical TyrO•),^[165,190] predicción que se encuentra en total contradicción con el valor teórico de ΔG_{SET} (16.72 kcal/mol), y, por lo tanto, es poco probable que el sistema reaccione a través

de un mecanismo EPST. Por consiguiente, los mecanismos de reparación probables son los mecanismos concertados HAT y PCET.

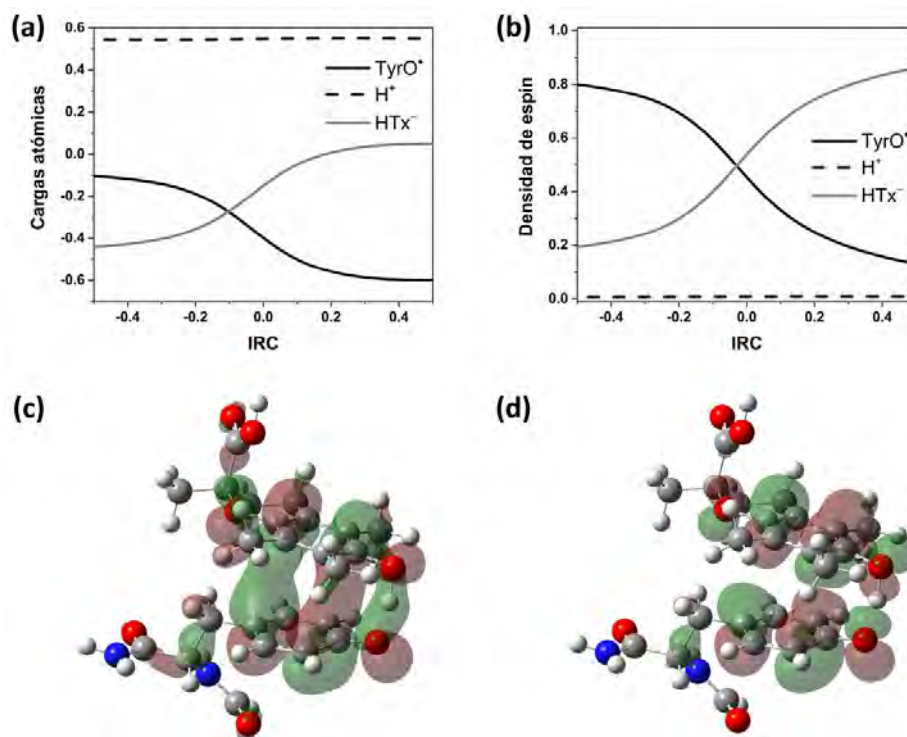


Figura 6.37. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y H₂Tx. Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

En la figura 6.37 se presentan los perfiles de evolución de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld en a través del IRC. La carga y densidad de espín del núcleo transferido son $\sim 0.5e$ y 0.007-0.009, valores asociados a un H⁺. Cerca de la geometría del TS, se observa la inversión de la carga y densidad de espín entre el donador y aceptor, característica que indica que el e⁻ se transfiere en la misma etapa que se transfiere el H⁺. Adicionalmente, los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados en la geometría del TS, y muestran la existencia de interacciones π - π *stacking* entre el donador y aceptor (figura 6.37). Por lo tanto, las características asociadas a la evolución de cargas y densidades de espín, así como a los orbitales HOMO y SOMO a la geometría del TS, indican que la reacción de reparación ocurre a través de un mecanismo PCET.

6.10.2.2. Reparación de Tyr por la fracción mono-aniónica del trolox (HTx^-).

La probabilidad de una reacción de transferencia de H^+ desde el grupo OH fenólico del mono-anión HTx^- ($pK_a = 11.92$)^[165] hacia el radical $TyrO^\bullet$ ($pK_a = -2$)^[93] es improbable, quedando descartada la posibilidad de un mecanismo de reparación PEST. El potencial de reducción del HTx^- a pH = 7 (la fracción de HTx^- es 99.99%) y del radical $TyrO^\bullet$ a pH = 7 (la fracción de $TyrO^\bullet$ es del 100%) son 0.48 y 0.94 V,^[165,190] valores que indican que la reacción SET se encuentra favorecida termodinámicamente ($E_{celda} = 0.46$ V y $\Delta G = -10.61$ kcal/mol). Sin embargo, el valor de ΔG_{SET} calculado (11.60 kcal/mol, tabla 6.30), se aleja mucho del valor esperado con base en potenciales de reducción experimentales, i.e., el mecanismo de reparación EPST se encuentra desfavorecido. Por lo tanto, el mecanismo de reacción probable debe corresponder a una reacción concertada HAT o PCET.

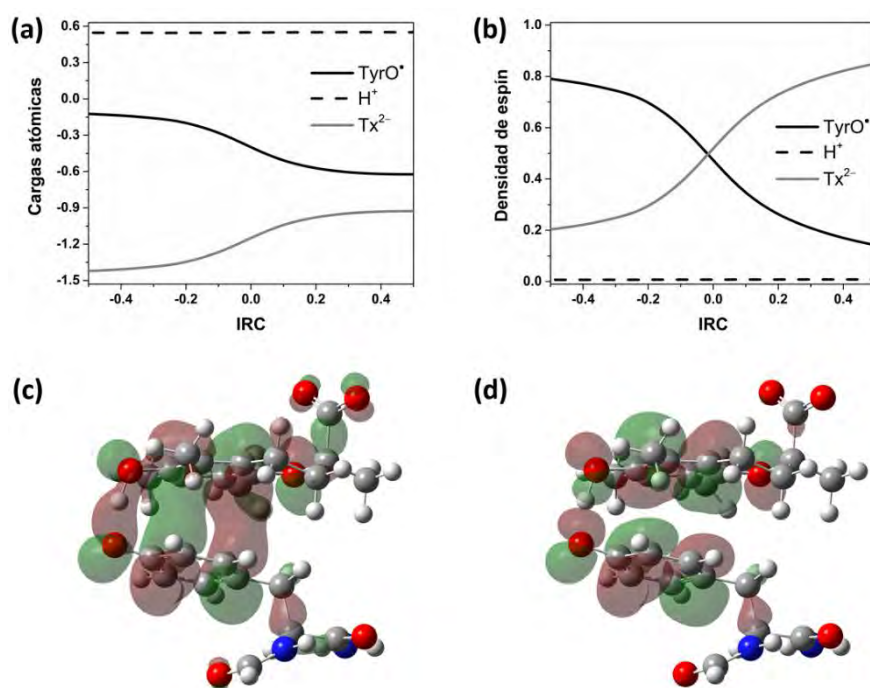


Figura 6.38. Reacción de reparación entre el radical $TyrO^\bullet$ y HTx^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

En la figura 6.38, se presentan los perfiles de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld en función del IRC. La carga y densidad de espín del núcleo transferido son $\sim 0.6e$ y 0.007-0.008, respectivamente, valores que corresponden a un H^+ . En el perfil de densidades de espín, se observa la inversión de la densidad entre el donador y aceptor, comportamiento que indica que el e^- se transfiere en la misma etapa que el H^+ . Los orbitales HOMO y SOMO, a la geometría del TS, se

encuentran deslocalizados y revelan la existencia de interacciones π - π *stacking*. Por lo tanto, la reparación del radical TyrO• por el mono-anión HTx⁻, ocurre a través de un mecanismo PCET.

6.10.3. Cinética de la reparación de tirosina por trolox (H_nTx^q).

En la tabla 6.31 se presentan los resultados del análisis cinético para la reparación del radical TyrO• por el H_nTx^q. Los mecanismos de reacción con las fracciones consideradas del reparador, H₂Tx y HTx⁻, ocurren a través del mecanismo PCET con energías de activación bajas. Sin embargo, a pH fisiológico, la reparación mediada por el mono-anión HTx⁻ contribuye con el 99.96% al valor de la k_{total} , y ocurre a velocidades controladas por la difusión. Por otro lado, a valores de pH ácidos, la contribución a la k_{total} desde la fracción H₂Tx, aumenta, figura 6.39.

Tabla 6.30. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(pH=7.4)}$, M⁻¹s⁻¹) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación del radical TyrO• por el H_nTx^q.

| H _n Tx ^q | Mecanismo ^[a] | ΔG^\ddagger ^[b] | $k^{(pH=7.4)}$ | Γ |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------|----------|
| H ₂ Tx | PCET | 4.60 | 5.93×10^5 | 0.04 |
| HTx ⁻ | PCET | 2.56 | 1.49×10^9 | 99.96 |
| k_{total} | | | 1.49×10^9 | 100 |

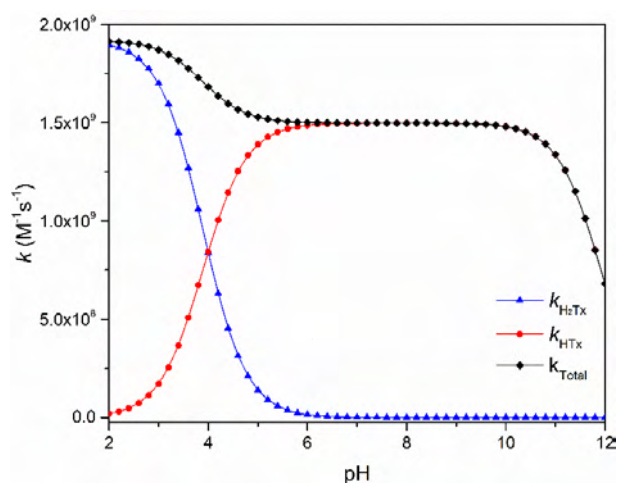


Figura 6.39. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO• por cada fracción del H_nTx^q.

A un valor de pH = 5 (lisosoma, pH = 4.7),^[185] la contribución desde la reacción entre el radical TyrO• y el H₂Tx es del 9.04%, con una k de velocidad igual a 1.38×10^8 M⁻¹s⁻¹, figura 6.39. El valor de k_{total} ,

calculada a pH = 7.4, es 3.9 veces más grande que la constante reportada experimentalmente ($k_{\text{exp}} = 3.83 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para el Tyr libre),^[18] resultado que demuestra la validez de la metodología utilizada para el análisis cinético. La diferencia entre el valor de k_{total} con respecto a k_{exp} , corresponde a un error 0.80 kcal/mol en el cálculo de barreras de activación.

La reparación en pentiletanoato presenta una energía de activación baja y una constante de velocidad alta, i.e., $\Delta G^\ddagger = 5.30 \text{ kcal/mol}$ y $k = 8.04 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, resultados que indican que la reparación puede ocurrir de forma eficiente en medio lipídico.

6.11. Reparación de tirosina por el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

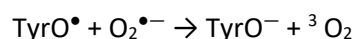
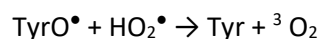
6.11.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de tirosina y el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

En la tabla 6.32, se presentan los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para las reacciones entre el radical TyrO^\bullet y los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^\bullet . Se consideraron tres caminos de reacción, la reacción FHT entre el radical TyrO^\bullet y el radical HO_2^\bullet , y las reacciones SET entre el radical TyrO^\bullet y los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^\bullet . La reacción FHT se encuentra altamente favorecida por ΔG_{rx} y ΔH_{rx} , al igual que la reacción SET, asociada al anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Por otro lado, la reacción SET con el radical HO_2^\bullet es altamente endergónica, de forma similar a los resultados obtenidos para la reparación del Trp.

Tabla 6.31. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación del radical TyrO^\bullet por los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^\bullet .

| Reacción | Reparador | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| FHT | HO_2^\bullet | -30.30 | -31.78 |
| SET | HO_2^\bullet | 66.90 | 66.34 |
| | $\text{O}_2^{\bullet-}$ | -17.66 | -18.16 |

Por lo tanto, dos reacciones pueden ser importantes para la reparación del radical TyrO^\bullet por los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$ y HO_2^\bullet , una reacción FHT y una reacción SET:



De forma similar a la reacción FHT entre los radicales $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y HOO^\bullet , la reacción entre el radical TyrO^\bullet y HOO^\bullet se encuentra desfavorecida entrópicamente ($T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = -1.48 \text{ kcal/mol}$), y la variación

de la entropía rotacional, al pasar de HOO^\bullet a ${}^3\text{O}_2$, corresponde a la principal contribución negativa la entropía de reacción ($T \cdot \Delta S_{\text{rot}} = -1.88$ kcal/mol).

Como se mencionó anteriormente, la única fracción disponible del reparador en medio lipídico, corresponde a la fracción neutra, HOO^\bullet . Los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} indican que la reacción de reparación es altamente exergónica, i.e., -34.32 y -35.95 kcal/mol, respectivamente. De forma similar a la reacción entre los radicales $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y HOO^\bullet , la reparación de TyrO^\bullet es más exergónica en medio lipídico en comparación al medio acuoso, por -4.02 kcal/mol. El valor de $T \cdot \Delta S_{\text{rx}}$ indica que la reacción se encuentra desfavorecida entrópicamente (-1.63 kcal/mol). La contribución desfavorable a la variación de entropía, proviene exclusivamente de la variación de $T \cdot \Delta S_{\text{rot}}$ al pasar del radical HOO^\bullet al ${}^3\text{O}_2$, i.e., $T \cdot \Delta S_{\text{rx}} = T \cdot \Delta S_{\text{rot}} = -1.63$ kcal/mol. La variación de entalpía de reacción es la fuerza impulsora de la reacción de reparación.

6.11.2. Mecanismos de reparación de radicales de Tyr por el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Lo valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} presentados en la tabla 6.32, indican que las reacciones FHT y SET del radical TyrO^\bullet con los radicales HOO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$, respectivamente, son altamente exergónicas. A continuación, se presentan los detalles asociados a los mecanismos de reparación.

6.11.2.1. *Reparación de Tyr por la fracción protonada del anión radical superóxido (HOO^\bullet).*

La reacción FHT entre el radical TyrO^\bullet y el radical HOO^\bullet se ha estudiado sobre una superficie de reacción en estado triplete, por la mismas razones que se expusieron para la reacción PEST entre los radicales $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ y HOO^\bullet , i.e., liberación de ${}^3\text{O}_2$. Debido a las propiedades ácido-base y redox de las especies reaccionando, los únicos mecanismos de reacción posibles son los mecanismos concertados HAT y PCET.

En la figura 6.40, se presentan el perfil de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld en función de la coordenada de reacción. La carga sobre el núcleo en transferencia es $\sim 0.5e$ y 0.027 - 0.029 , respectivamente, valores que ponen en evidencia el carácter de H^+ . El aumento y disminución de la densidad de espín para el donador y aceptor, respectivamente, indica que el e^- se transfiere de forma simultánea con el H^+ , razón por la cual ocurre la inversión de carga entre el donador y el aceptor. Por lo tanto, la evolución de las cargas y densidades de espín con el avance de la reacción, indican que el mecanismo corresponde a un mecanismo PCET. Nótese que la densidad del donador evoluciona hacia un valor de ~ 2 , acorde con la formación de ${}^3\text{O}_2$.

El análisis de orbitales moleculares a la geometría del TS, demostró que el orbital doblemente ocupado de mayor energía, presenta interacciones π - π *stacking* entre el donador y aceptor, interacciones que abren un canal de transferencia electrónica y permiten que la reacción ocurra a través de un mecanismo PCET, figura 6.41.

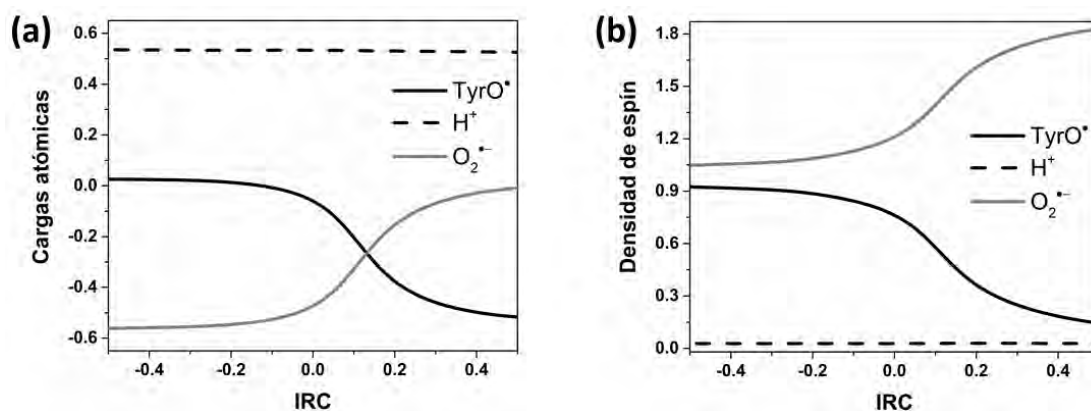


Figura 6.40. Reacción de reparación entre el radical TyrO• y HOO•. Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción.

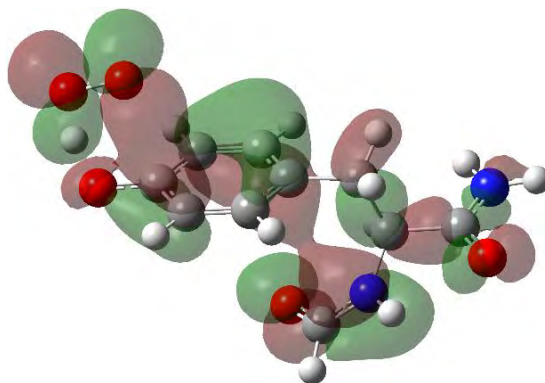


Figura 6.41. Orbital molecular doblemente ocupado de mayor energía a la geometría del estado de transición para la reacción entre los radicales TyrO• y HOO• (valor de isodensidad de 0.02 au).

Esta reacción fue estudiada considerando pentil-etanoato como solvente, y los resultados indican que la reparación puede ocurrir en medio lipídico a través de un mecanismo PCET, i.e., el mecanismo se conserva al pasar de medio acuoso a medio lipídico.

6.11.2.2. Reparación de Tyr por el anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

La reacción de reparación del radical TyrO \bullet por el anión radical $O_2^{\bullet-}$, ocurre a través de mecanismo de reacción SET. Para esta reacción no se pudo calcular un complejo de reactivos, y la energía de reorganización del solvente (λ_o) se calculó considerando que el radio del complejo de transferencia electrónica es la suma del radio de los reactivos.

6.11.3. Cinética de la reparación de tirosina por el anión radical superóxido ($H_nO_2^{\bullet q}$).

En la tabla 6.33 se presentan las constantes de velocidad calculadas para la reparación del radical TyrO \bullet por el $H_nO_2^{\bullet q}$. La fracción HOO \bullet repara al radical TyrO \bullet a través de un mecanismo PCET con una barrera de activación baja, $\Delta G^\ddagger_{PCET} = 2.36$ kcal/mol, y una k de velocidad igual a 3.42×10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ a pH fisiológico. El anión radical $O_2^{\bullet-}$ reacciona con el radical TyrO \bullet a través de un mecanismo SET con una energía de activación baja, $\Delta G^\ddagger_{SET} = 3.72$ kcal/mol, y una k de velocidad controlada por la difusión a pH fisiológico, i.e., 2.70×10^9 M $^{-1}$ s $^{-1}$. La reacción SET contribuye con el 99.68% al valor de la k_{total} a pH = 7.4.

Tabla 6.32. Energía libre de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(pH=7.4)}$, M $^{-1}$ s $^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para los mecanismos de reparación del radical TyrO \bullet por el $H_nO_2^{\bullet q}$.

| $H_nO_2^{\bullet q}$ | Mecanismo ^[a] | ΔG^\ddagger [b] | $k^{(pH=7.4)}$ | Γ |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|----------|
| HO $_2^{\bullet}$ | PCET | 2.36 | 3.42×10^6 | 0.32 |
| $O_2^{\bullet-}$ | SET | 3.72 | 2.69×10^9 | 99.68 |
| k_{total} | | | 2.70×10^9 | 100 |

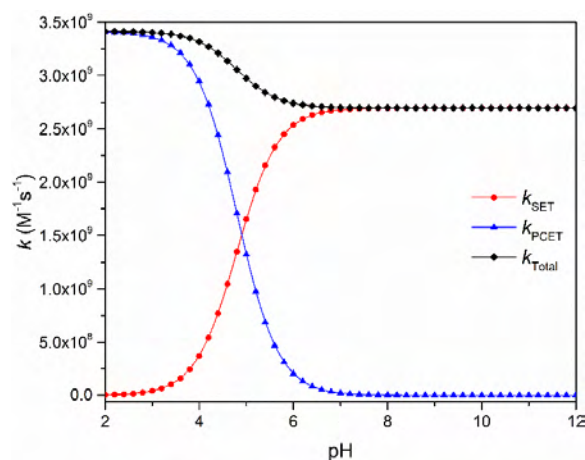


Figura 6.42. Dependencia del pH para las constantes de velocidad para la reparación del radical TyrO \bullet por cada fracción del $H_nO_2^{\bullet q}$.

A valores de pH inferiores al fisiológico, la reacción PCET cobra importancia, i.e., $k_{\text{PCET}} = 1.65 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH = 5 y contribuye con el 55.6% al valor de k_{total} , figura 6.42. La constante de velocidad para la reparación, reportada experimentalmente a pH fisiológico, es del orden de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$,^[171] y, por lo tanto, el resultado teórico reproduce los datos disponibles en la literatura.

En pentiletanoato, la reacción entre los radicales TyrO• y HOO• ocurre sin barrera ($\Delta G_{\text{PCET}}^\ddagger = 0.00 \text{ kcal/mol}$), a velocidades controladas por la difusión, $k_{\text{PCET}} = 9.44 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y a través de un mecanismo de reacción PCET. Por lo tanto, se puede esperar que el radical HOO• repare de forma eficiente al radical TyrO• en medio lipídico.

6.12. Reparación de leucina por el ácido úrico ($\text{H}_n\text{Ur}^{\text{a}}$).

6.12.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y ácido úrico ($\text{H}_n\text{Ur}^{\text{a}}$).

En la tabla 6.34 se muestran la termoquímica de las reacciones de reparación entre los radicales de Leu y el ácido $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{a}}$. Para este sistema existen 36 reacciones posibles, de las cuales, 32 mostraron ser favorables termodinámicamente. Las reacciones de reparación del C_α son las menos exergónicas, consecuencia del efecto captodativo que estabiliza el radical libre y desfavorece el proceso de reparación, en comparación a los radicales en C_β , C_γ y C_δ de Leu, los cuales presentan valores de ΔG_{rx} favorables. La exergonicidad de las reacciones refleja la estabilidad esperada para los radicales libres de Leu en la cadena alifática (isobutil), disminuyendo la reactividad con el grado de sustitución, i.e., la reactividad de los radicales disminuye en el orden $\text{C}_\delta > \text{C}_\beta > \text{C}_\gamma$.

Los valores en la tabla 6.34 indican que, para la mayoría de sistemas, el proceso de reparación se encuentra asociado a una disminución de la entropía. La reparación de los radicales en C_β , C_γ y C_δ , viene acompañada de una disminución en la entropía vibracional, consecuencia del aumento en las barreras rotacionales de los grupos enlazados directamente a esos radicales, i.e., los valores $T \cdot \Delta S_{\text{vib}}$ para la reducción de los radicales en C_β , C_γ y C_δ son -0.35, -0.38 y -0.58 kcal/mol, respectivamente.

Por otro lado, el radical en C_α presenta un comportamiento opuesto, la entropía vibracional aumenta ($T \cdot \Delta S_{\text{vib}} = 0.59 \text{ kcal/mol}$) debido a la desaparición del efecto captodativo que estabiliza el radical. La fuerza motriz de todas las reacciones, corresponde a la formación del enlace C-H en los productos reparados, i.e., el enlace C-H formado en la Leu es 3.7-11.5 kcal/mol más fuerte en comparación a los enlaces N-H en el ácido úrico.

Tabla 6.33. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Leu por H_nUr^q .

| Reparador | NH | Radical | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|------------|----|------------|-----------------|-----------------|
| H_3Ur | 1 | | -0.69 | -0.61 |
| | 2 | C_α | -0.41 | -0.20 |
| | 3 | | 0.26 | 0.33 |
| | 4 | | 11.48 | 11.60 |
| | 1 | | -14.26 | -14.36 |
| | 2 | C_β | -13.99 | -13.95 |
| | 3 | | -13.31 | -13.42 |
| | 4 | | -2.09 | -2.15 |
| | 1 | | -9.28 | -10.16 |
| | 2 | C_γ | -9.00 | -9.74 |
| | 3 | | -8.33 | -9.21 |
| | 4 | | 2.89 | 2.06 |
| | 1 | | -14.67 | -15.81 |
| | 2 | C_δ | -14.40 | -15.39 |
| | 3 | | -13.72 | -14.86 |
| | 4 | | -2.51 | -3.59 |
| 2 | | | -1.60 | -1.42 |
| H_2Ur^- | 3 | C_α | -6.55 | -6.44 |
| | 4 | | 6.23 | 6.53 |
| | 2 | | -15.17 | -15.16 |
| | 3 | C_β | -20.12 | -20.19 |
| | 4 | | -7.34 | -7.22 |
| | 2 | | -10.19 | -10.96 |
| | 3 | C_γ | -15.14 | -15.98 |
| | 4 | | -2.36 | -3.01 |
| | 2 | | -15.59 | -16.61 |
| | 3 | C_δ | -20.54 | -21.63 |
| | 4 | | -7.76 | -8.66 |
| | 3 | | | -7.92 |
| HUr^{2-} | 4 | C_α | -0.57 | -0.66 |
| | 3 | | -21.49 | -22.03 |
| | 4 | C_β | -14.15 | -14.41 |
| | 3 | | -16.51 | -17.82 |
| | 4 | C_γ | -9.17 | -10.20 |
| | 3 | | -21.90 | -23.47 |
| | 4 | C_δ | -14.56 | -15.85 |

Debido al número de posibilidades para el sistema Leu- H_nUr^q , para el análisis cinético se han considerado únicamente las reacciones más exergónicas, que de acuerdo al principio del Bell-Evans-

Polanyi,^[134,192] deben corresponder a las reacciones con energías de activación menores. Tales reacciones son: la fracción H₃Ur en la posición NH 1 y las fracciones H₂Ur⁻ y HUr²⁻ en las posiciones NH 3, con todos los radicales de Leu (valores en negrilla, tabla 6.34). Para el análisis mecanístico, sólo se ha considerado la reacción entre el radical en C_γ y la posición NH 3 de la fracción H₂Ur⁻.

Es importante notar que, las reacciones de reparación de los radicales de Leu ocurren a través de un mecanismo HAT, el cual no se verá afectado por la posición de reacción en el donador (lo que se demuestra en sección 6.16 al determinar que, independiente del reparador, las reacciones siempre ocurren a través del mecanismo HAT). Por lo tanto, el análisis mecanístico y cinético de las reacciones de reparación más exergónicas son representativos de lo que ocurre para el resto de reacciones a nivel mecanístico. Sin embargo, en el caso en que las reacciones estudiadas presenten barreras de activación bajas que den origen a constantes de velocidad rápidas, el total de las reacciones serán incluidas en el análisis cinético.

Las reacciones SET no han sido consideradas en el estudio de reparación del daño en Leu, debido a que todas presentan valores altamente endergónicos. Los datos termodinámicos para las reacciones SET entre radicales de Leu y las especies reparadoras, se anexan en el apéndice A4. El lector puede verificar que dichos procesos no son de importancia para la reparación del daño en Leu.

En la tabla 6.35 se presentan los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para las reacciones de reparación de radicales de Leu por el H₃Ur en pentiletanoato. De dieciséis reacciones consideradas, once demostraron ser exergónicas. Al igual que para la reparación de Trp_(-H)[•] por H₃Ur, la posición más reactiva del reparador corresponde al NH 2, consecuencia de un menor momento dipolar del radical formado es esa posición en comparación al radical formado en la posición NH 1, i.e., el radical sobre la posición NH 2 corresponde a la especie más estable en un medio con baja constante dieléctrica.

Al igual que en medio acuoso, la exergonicidad de las reacciones refleja la estabilidad de los radicales libres de Leu en la cadena alifática (isobutil), disminuyendo la reactividad con el grado de sustitución, i.e., la reactividad disminuye en el orden C_δ > C_β > C_γ. El radical en C_α, es el radical más estable, y, por lo tanto, el más difícil de reparar. La estabilidad del radical en C_α, es consecuencia del efecto captodativo, el cual se caracteriza por deslocalización electrónica del radical sobre el grupo amino y grupo carbonilo enlazados al C_α.

La mayoría de reacciones presentan efectos entrópicos desfavorables, siendo la excepción la reparación de los radicales en C_α, consecuencia de la desaparición del efecto captodativo durante

el proceso de reducción. La principal fuerza motriz, para todas las reacciones, corresponde a la variación de entalpía.

Tabla 6.35. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de radicales de Leu por H₃Ur en pentiletanoato.

| Reparador | NH | Radical | ΔG_{rx} (kcal/mol) | ΔH_{rx} (kcal/mol) |
|-------------------|----|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| H ₃ Ur | 1 | C _{α} | -0.58 | -0.53 |
| | 2 | | -0.85 | -0.69 |
| | 3 | | 2.76 | 2.75 |
| | 4 | | 17.95 | 18.20 |
| | 1 | C _{β} | -14.37 | -15.89 |
| | 2 | | -14.64 | -16.05 |
| | 3 | | -11.03 | -12.61 |
| | 4 | | 4.16 | 2.83 |
| | 1 | C _{γ} | -10.49 | -11.39 |
| | 2 | | -10.76 | -11.55 |
| | 3 | | -7.14 | -8.11 |
| | 4 | | 8.05 | 7.34 |
| | 1 | C _{δ} | -16.60 | -17.47 |
| | 2 | | -16.86 | -17.63 |
| | 3 | | -13.25 | -14.19 |
| | 4 | | 1.94 | 1.26 |

6.12.2. Cinética de la reparación de leucina por el ácido úrico (H_nUr^q).

En las tablas 6.36 y 6.37, se presentan los resultados del análisis cinético para la reparación de radicales de Leu por H_nUr^q en medio acuoso y lipídico, respectivamente. Únicamente se han considerado las posiciones más reactivas para cada fracción del H_nUr^q, las cuales deben ser representativas de la capacidad reparadora de Leu.

Las energías de activación son relativamente altas para todas las reacciones consideradas, tanto en medio acuoso como lipídico. Como consecuencia, las constantes de velocidad para la reparación son realmente bajas y no pueden competir con la adición de oxígeno molecular sobre los radicales de Leu.^[103] Estos resultados demuestran que, el H_nUr^q es un antioxidante incapaz de reparar radicales libres centrados en átomos de carbono de residuos de aminoácidos alifáticos, conocidos marcadores del estrés oxidativo.

Las constantes de velocidad no han sido corregidas para las fracciones de los radicales de Leu, porque dichas fracciones son dependientes del radical que induce el daño, y, por lo tanto, esos valores corresponden a límites superiores para la velocidad de reparación.

Tabla 6.35. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el H_nUr^q en medio acuoso.

| H_nUr^q | Radical | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|--------------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|----------|
| H_3Ur (NH 1) | C_α | 30.92 | 3.30×10^{-12} | 0.00 |
| | C_β | 19.57 | 3.47×10^{-1} | 0.06 |
| | C_γ | 20.97 | 3.04×10^{-2} | 0.01 |
| | C_δ | 21.19 | 1.19×10^{-2} | 0.00 |
| H_2Ur^- (NH 3) | C_α | 25.44 | 1.96×10^{-2} | 0.00 |
| | C_β | 17.53 | 2.22×10^2 | 39.02 |
| | C_γ | 17.82 | 4.45×10^1 | 7.81 |
| | C_δ | 16.95 | 2.76×10^2 | 48.34 |
| HUr^{2-} (NH 3) | C_α | 19.41 | 1.14×10^{-2} | 0.00 |
| | C_β | 12.78 | 7.29×10^0 | 1.28 |
| | C_γ | 13.10 | 4.83×10^0 | 0.85 |
| | C_δ | 12.00 | 1.49×10^1 | 2.62 |
| k_{total} | | | 5.70×10^2 | 100 |

Tabla 6.36. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el H_3Ur en petiletanoato.

| H_nUr^q | Radical | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|------------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|----------|
| H_3Ur (NH 2) | C_α | 31.36 | 6.41×10^{-11} | 0.00 |
| | C_β | 19.12 | 5.01×10^1 | 96.29 |
| | C_γ | 23.48 | 7.56×10^{-1} | 1.45 |
| | C_δ | 22.28 | 1.18×10^0 | 2.26 |
| k_{total} | | | 5.21×10^1 | 100 |

6.13. Reparación de reparación de leucina por el ácido ascórbico (H_nAsc^q).

6.13.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y ácido ascórbico (H_nAsc^q).

En la tabla 6.38 se presentan los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para la reparación de Leu por el H_nAsc . Todas las reacciones FHT son altamente exergónicas y suman un total de 12 caminos de posibles. Al igual que los sistemas discutidos anteriormente, los valores de entalpía revelan un ligero efecto entrópico desfavorable, consecuencia de la variación en la entropía vibracional discutida previamente para los radicales de Leu y las fracciones de reparador.

Tabla 6.38. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Leu por H_nAsc^q .

| Reparador | OH | Radical | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|-----------|----|------------|-----------------|-----------------|
| H_2Asc | 1 | C_α | -5.21 | -5.21 |
| | 2 | | -3.51 | -3.54 |
| | 1 | C_β | -18.79 | -18.95 |
| | 2 | | -17.08 | -17.29 |
| | 1 | C_γ | -13.80 | -14.75 |
| | 2 | | -12.10 | -13.09 |
| | 1 | C_δ | -19.20 | -20.40 |
| | 2 | | -17.49 | -18.73 |
| $HAsc^-$ | 2 | C_α | -15.64 | -15.86 |
| | 2 | C_β | -29.21 | -29.60 |
| | 2 | C_γ | -24.23 | -25.40 |
| | 2 | C_δ | -29.62 | -31.05 |

La entalpía es la fuerza motriz de las reacciones de reparación de Leu por el H_nAsc^q . La fuerza de los enlaces C-H es considerablemente mayor que la fuerza de los enlaces O-H que se rompen en el H_nAsc^q . Para el radical en C_α , la energía del enlace C-H formado es 3.4-5.1 kcal/mol más fuerte que los enlaces O-H que se rompen en el H_2Asc y 15.5 kcal/mol más fuerte que los enlaces O-H que se rompen en el $HAsc^-$. Y para el radical en C_δ , la energía del enlace C-H formado es 17.4-19.1 kcal/mol y 29.5 kcal/mol más fuerte que el enlace O-H en H_2Asc y $HAsc^-$, respectivamente. El aumento en la fuerza de los enlaces C-H formados para los radicales C_β y C_γ , se encuentra en un rango intermedio a los valores para los enlaces formados en C_α y C_δ .

Debido a que el H_nAsc es considerado un antioxidante excelente, las 12 reacciones han sido consideradas en el análisis cinético. Sin embargo, ya que el total de dichas reacciones debe ocurrir

a través de un mecanismo HAT, únicamente se realizó el análisis mecanístico para la reparación del radical en C_γ por el mono-anión HAsc^- . El radical C_γ es el que se forma en mayor proporción cuando la Leu es oxidada por los radicales HO^\bullet y Cl^\bullet , y el mono-anión HAsc^- , además de presentar los valores de ΔG_{rx} más negativos (tabla 6.38), es la fracción más abundante del H_nAsc^n a pH fisiológico.

En la tabla 6.39 se presentan los datos de viabilidad termodinámica para la reparación de radicales de Leu por H_2Asc en pentiletanoato. Todas las reacciones mostraron ser exergónicas, con valores altamente favorables para la reparación en C_β , C_γ y C_δ . La reacción menos exergónica, corresponde a la reparación del radical en C_α , consecuencia, como ya se discutió, del efecto captodativo que le confiere al radical una estabilidad intrínseca mucho mayor en comparación a los radicales de la cadena alifática. La mayoría de reacciones son más exergónicas con respecto al medio acuoso, siendo la excepción la reparación de los radicales C_α y C_β por la posición OH 2 del H_2Asc .

Tabla 6.38. Datos de viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación de radicales de Leu por H_2Asc en pentiletanoato.

| Reparador | OH | Radical | ΔG_{rx} (kcal/mol) | ΔH_{rx} (kcal/mol) |
|--------------------|----|----------------|----------------------------|----------------------------|
| H ₂ Asc | 1 | C _α | -5.45 | -5.50 |
| | 2 | | -2.84 | -2.75 |
| | 1 | C _β | -19.24 | -20.87 |
| | 2 | | -16.63 | -18.12 |
| | 1 | C _γ | -15.36 | -16.37 |
| | 2 | | -12.75 | -13.62 |
| | 1 | C _δ | -21.47 | -22.44 |
| | 2 | | -18.86 | -19.69 |

Los efectos entrópicos para la reparación del radical en C_α son ligeramente favorables. Por otro lado, para los radicales en C_β , C_γ y C_δ , la entropía de reacción disminuye, característica que desfavorece los procesos de reparación. Los valores en la tabla 6.39, de la misma forma que todos los sistemas presentados anteriormente, indican que corresponde a la fuerza impulsora de las reacciones de reparación de radicales de Leu por H_2Asc .

6.13.2. Cinética de la reparación de leucina por el ácido ascórbico (H_nAsc^n).

En la tabla 6.40 y 6.41 se presentan las constantes de velocidad para la reparación de radicales de Leu por el H_nAsc^n en medio acuoso y lipídico, respectivamente. Las energías de activación para la reparación mediada por la fracción H_2Asc , en medio acuoso y lipídico, son relativamente altas, y,

por lo tanto, las velocidades de reacción bajas. i.e., la contribución al valor de k_{total} en medio acuoso es del 0.0 %, y la magnitud de k_{total} en pentiletanoato es del orden de $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Adicional a las energías de activación altas, en medio acuoso, la fracción de H_2Asc es muy pequeña, i.e., 6.31×10^{-4} a $\text{pH} = 7.4$.

Tabla 6.39. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el H_nAsc^q en medio acuoso.

| H_nAsc^q | OH | Radical | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|--------------------------|----|-------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| H_2Asc | 1 | C_α | 26.77 | 5.60×10^{-6} | 0.00 |
| | | C_β | 16.39 | 5.02×10^{-1} | 0.00 |
| | | C_γ | 17.49 | 5.90×10^{-2} | 0.00 |
| | | C_δ | 16.01 | 5.26×10^{-1} | 0.00 |
| | 2 | C_α | 20.21 | 3.01×10^{-3} | 0.00 |
| | | C_β | 13.56 | 6.30×10^0 | 0.00 |
| | | C_γ | 13.08 | 8.28×10^0 | 0.00 |
| | | C_δ | 12.82 | 1.10×10^1 | 0.00 |
| HAsc^- | 2 | C_α | 19.95 | 1.20×10^1 | 0.00 |
| | | C_β | 5.82 | 3.35×10^8 | 65.00 |
| | | C_γ | 6.20 | 1.77×10^8 | 34.21 |
| | | C_δ | 8.44 | 4.05×10^6 | 0.78 |
| | | | k_{total} | 5.16×10^8 | 100 |

Tabla 6.40. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el H_2Asc en petiletanoato.

| OH | Radical | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ | |
|----|-------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|-----|
| 1 | C_α | 24.67 | 4.43×10^{-2} | 0.00 | |
| | C_β | 15.84 | 3.82×10^2 | 0.00 | |
| | C_γ | 14.54 | 3.45×10^3 | 0.68 | |
| | C_δ | 13.07 | 1.93×10^4 | 12.81 | |
| 2 | C_α | 23.82 | 8.19×10^{-3} | 6.17 | |
| | C_β | 13.60 | 7.16×10^3 | 15.28 | |
| | C_γ | 13.60 | 8.54×10^3 | 34.62 | |
| | C_δ | 13.23 | 1.70×10^4 | 30.43 | |
| | | | k_{total} | 5.59×10^4 | 100 |

Por otro lado, el mono-anión HAsc^- demostró ser un reparador eficiente de los radicales de Leu localizados en C_β y C_γ , con constantes de velocidad del orden de $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Es un resultado de relevancia biológica, considerando que esos dos radicales corresponden a los que se forman en mayor proporción cuando la Leu es oxidada por el radical HO^\bullet , i.e., 30.5 % en C_β y 31.7 % en C_γ . A valores de pH inferiores al fisiológico, la reparación mediada por HAsc^- , sigue siendo el camino de reacción dominante. i.e., a pH = 5.0 la k de velocidad asociada a la fracción HAsc^- es $4.46 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Las constantes de velocidad presentadas en las tablas 6.40 y 6.41, no han sido corregidas para las fracciones de los radicales de Leu, porque, como ya se comentó, son dependientes del radical que ocasiona el daño.

6.14. Reparación de reparación de leucina por el glutatión (GSH_n^q).

6.14.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y glutatión (GSH_n^q).

En la tabla 6.42 se presentan los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} para la reparación de Leu por GSH_n^q . Dos especies del GSH_n^q , de las tres presentes a pH fisiológico, puede participar en el proceso de reparación: GSH_2 y GSH^- , esquema 4.6.

Tabla 6.41. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Leu por GSH_n^q .

| Reparador | Radical | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| GSH_2 | C_α | -2.82 | -1.72 |
| | C_β | -16.40 | -15.47 |
| | C_γ | -11.42 | -11.26 |
| | C_δ | -16.81 | -16.91 |
| GSH^- | C_α | -1.72 | -1.37 |
| | C_β | -15.30 | -15.12 |
| | C_γ | -10.31 | -10.92 |
| | C_δ | -15.71 | -16.56 |

Los valores de ΔG_{rx} y ΔH_{rx} indican que, todos los radicales de Leu pueden ser reparados por las dos fracciones, y, por lo tanto, todas las reacciones deben ser consideradas importantes. Para este caso de estudio, los efectos entrópicos negativos para la reparación de los radicales C_γ y C_δ son consecuencia de la disminución en la entropía vibracional de los radicales de Leu al ser reducidos,

i.e., los valores de $T \cdot \Delta S_{\text{vib}}$ son positivos para el proceso de oxidación de las dos fracciones de GSH_n^{q} . Por otro lado, el efecto entrópico para la reparación del radical C_{α} , refleja el aumento en los grados de libertad vibracional al desaparecer el efecto captodativo durante el proceso de reducción.

Al igual que la reparación con $\text{H}_n\text{Ur}^{\text{q}}$ y $\text{H}_n\text{Asc}^{\text{q}}$, la reacción de reparación con GSH^- es promovida por la variación de entalpía. La energía de enlace C-H es mayor que el enlace S-H por 2.3, 15.8, 10.9 y 16.3 kcal/mol para los radicales C_{α} , C_{β} , C_{γ} y C_{δ} , respectivamente.

6.14.2. Cinética de la reparación de leucina por el glutatión (GSH_n^{q}).

En la tabla 6.43 se muestra el resultado del análisis cinético para las reacciones de reparación de radicales de Leu por el GSH^- . De los tres antioxidantes considerados, el GSH^- demostró ser el reparador más eficiente del daño ocasionado por radicales a libres a residuos de Leu. La k_{total} para el proceso de reparación es controlada por la difusión, i.e., $k_{\text{total}} = 3.38 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tabla 6.42. Energías libres de activación (ΔG^{\ddagger} , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el GSH_n^{q} .

| GSH_n^{q} | Radical | ΔG^{\ddagger} | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| GSH_2 | C_{α} | 12.12 | 5.16×10^0 | 0.00 |
| | C_{β} | 3.40 | 3.07×10^5 | 0.01 |
| | C_{γ} | 3.49 | 2.99×10^5 | 0.01 |
| | C_{δ} | 3.60 | 2.35×10^5 | 0.01 |
| GSH^- | C_{α} | 13.04 | 7.68×10^3 | 0.00 |
| | C_{β} | 4.79 | 9.94×10^8 | 31.70 |
| | C_{γ} | 5.97 | 2.24×10^8 | 7.13 |
| | C_{δ} | 3.54 | 1.92×10^9 | 61.13 |
| k_{total} | | | 3.13×10^9 | 100 |

El radical en C_{α} , es el único que no se repara eficientemente, con una constante de velocidad del orden de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La contribución más importante al valor de k_{total} , proviene de la reparación del radical en C_{δ} (61.13%), seguida de la reparación en C_{β} (31.70%) y, finalmente, C_{γ} (7.13%). Este resultado es muy importante, considerando que la concentración intracelular de GSH_n^{q} en los seres humanos, es relativamente alta ($\sim 0.1\text{--}10 \text{ mM}$)^[16,156] y el daño en residuos de Leu ha sido identificado como un marcador de estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades, como la aterosclerosis.^[98]

Al igual que para la reparación por H_nUr^q y H_nAsc^q , las constantes de velocidad en la tabla 6.43, no han sido corregidas para las fracciones de los radicales de Leu. La reparación por la fracción completamente GSH_2 no contribuye a la k_{total} a pH fisiológico, sin embargo, a valores de pH ácidos, aumenta la velocidad de reparación, i.e., a pH = 4 el valor de k_{GSH_2} es $6.43 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, mostrando un incremento de ~ 3 órdenes de magnitud con respecto al valor a pH = 7.4.

6.15. Reparación de reparación de leucina por el trolox (H_nTx^q).

6.15.1. Termoquímica de las reacciones entre radicales de leucina y trolox (H_nTx^q).

En la tabla 6.44 se presentan los datos de viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación de radicales de Leu por el H_nTx^q . Todas las reacciones presentan valores de ΔG_{rx} favorables, y, por lo tanto, todas pueden ser importantes en el proceso de reparación de radicales de Leu mediado por el H_nTx^q .

Tabla 6.43. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) y entalpías (ΔH_{rx} , kcal/mol) de reacción para la reparación de Leu por H_nTx^q .

| Reparador | Radical | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|-----------|------------|-----------------|-----------------|
| H_2Tx | C_α | -7.31 | -7.00 |
| | C_β | -20.88 | -20.75 |
| | C_γ | -15.90 | -16.55 |
| | C_δ | -21.30 | -22.19 |
| HTx^- | C_α | -9.96 | -8.83 |
| | C_β | -23.53 | -22.57 |
| | C_γ | -18.55 | -18.37 |
| | C_δ | -23.94 | -24.02 |

Los efectos entrópicos para las reacciones entre la fracción H_2Tx y los radicales centrados en C_α y C_β , son favorables. Para las reacciones entre la fracción H_2Tx y los radicales centrados en C_γ y C_δ , son desfavorables. Por otro lado, para las reacciones entre el mono-anión HTx^- y los radicales centrados en C_α , C_β y C_γ , los efectos entrópicos son favorables, y para la reacción con el C_δ , son desfavorables. Las contribuciones entrópicas negativas, como se discutió previamente, proviene de la disminución en la entropía vibracional de los radicales en C_γ y C_δ durante del proceso de reducción. Para la reacción entre los radicales con la fracción H_2Tx , el proceso de oxidación de la fracción H_2Tx también contribuye al efecto entrópico desfavorable, i.e., el valor de $T \cdot \Delta S_{vib}$ es 0.33 kcal/mol al pasar de H_2Tx a HTx^\bullet .

Para todas las reacciones, la variación de entalpía es la fuerza impulsora de la reacción. El enlace C-H formado en el C_α es 7.2 y 9.8 kcal/mol más fuerte que el enlace O-H que se rompe en H_2Tx y HTx^- , respectivamente; para el C_β es 20.7 y 23.4 kcal/mol más fuerte; para el C_γ es 15.8 y 18.4 kcal/mol; y para el C_δ es 21.2 y 23.8 kcal/mol.

En la tabla 6.45, se presentan los datos de viabilidad termodinámica en pentiletanoato para las reacciones de reparación de los radicales de Leu por el H_2Tx . Las cuatro reacciones estudiadas demostraron ser exergónicas, y, por lo tanto, pueden ser importantes para la reparación de Leu en medio lipídico.

Tabla 6.44. Datos de viabilidad termodinámica para las reacciones de reparación de radicales de Leu por H_2Tx en pentiletanoato.

| Reparador | Radical | ΔG_{rx} (kcal/mol) | ΔH_{rx} (kcal/mol) |
|-----------|------------|----------------------------|----------------------------|
| H_2Tx | C_α | -6.40 | -6.34 |
| | C_β | -20.19 | -21.71 |
| | C_γ | -16.31 | -17.21 |
| | C_δ | -22.42 | -23.28 |

Los efectos entrópicos de las reacciones de reparación de los radicales centrados en C_β , C_γ y C_δ , son desfavorables, consecuencia de la disminución en la entropía vibracional al pasar de reactivos a productos. La desaparición del efecto captodativo durante el proceso de reparación del radical en C_α , favorece ligeramente la entropía del proceso. Al igual que para las reacciones discutidas con anterioridad, la entalpía es la fuerza que promueve las reacciones de reparación entre radicales de Leu y el H_2Tx .

6.15.2. Cinética de la reparación de leucina por el trolox (H_nTx^q).

En la tabla 6.46 y 6.47 se presentan los resultados del análisis cinético para reparación de radicales de Leu por el H_nTx^q en medio acuoso y pentiletanoato, respectivamente. Las energías de activación para todas las reacciones son altas ($\Delta G^\ddagger > 13.0$ kcal/mol) y, por lo tanto, las k de velocidad son lentas, i.e., $k_{total} = 4.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La reparación en pentiletanoato presenta energía de activación parecidas al medio acuoso ($\Delta G^\ddagger > 12.6$ kcal/mol) y la k de reparación indica que las reacciones ocurren lentamente, i.e., $k_{total} = 7.43 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La k_{total} de velocidad en medio lipídico es ~ 1 orden de magnitud mayor en comparación a la k_{total} en medio acuoso, sin embargo, la reacción no es lo suficientemente rápida como para evitar la segunda

etapa de daño, i.e., la adición de $^3\text{O}_2$ a los radicales centrados en los átomos de carbono de la Leu, proceso que resulta en la formación de los correspondientes radicales peroxilo.^[103] Por lo tanto, el H_nTx^q es incapaz de reparar el daño ocasionado por radicales libres a los residuos de Leu en proteínas, tanto en medio acuoso como en medio lipídico.

Tabla 6.45. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el H_nTx^q .

| H_nTx^q | Radical | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|-------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| H_2Tx | C_α | 24.18 | 5.75×10^{-6} | 0.00 |
| | C_β | 13.72 | 5.78×10^{-1} | 0.00 |
| | C_γ | 13.57 | 5.75×10^{-1} | 0.00 |
| | C_δ | 13.38 | 2.01×10^{-1} | 0.00 |
| HTx^- | C_α | 24.48 | 9.38×10^{-2} | 21.39 |
| | C_β | 14.16 | 8.83×10^3 | 13.18 |
| | C_γ | 14.35 | 5.44×10^3 | 13.18 |
| | C_δ | 12.61 | 2.70×10^4 | 65.43 |
| k_{total} | | | 4.13×10^4 | 100 |

Tabla 6.46. Energías libres de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol), constantes de velocidad ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su contribución a la constante de velocidad total (Γ , %), a 298.15 K, para la reparación de radicales de Leu por el H_2Tx en pentiletanoato.

| Radical | ΔG^\ddagger | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|--------------------|---------------------|-----------------------|----------|
| C_α | 24.18 | 6.40×10^{-4} | 0.00 |
| C_β | 13.72 | 7.17×10^2 | 0.10 |
| C_γ | 13.57 | 3.62×10^2 | 0.05 |
| C_δ | 13.38 | 7.42×10^5 | 99.85 |
| k_{total} | | 7.43×10^5 | 100 |

6.16. Mecanismos de reparación de radicales de Leu.

Los radicales de Leu centrados en átomos de carbono, independiente de la especie reparadora, reaccionan, de forma exclusiva, a través del mecanismo HAT. El análisis mecanístico se ha realizado para las reacciones del radical C_γ en medio acuoso, porque ha sido identificado como el radical que se genera en mayor proporción al reaccionar con diferentes radicales libres (N_3^\bullet , Cl^\bullet , HO^\bullet , $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$,

$\text{ClCH}_2\text{O}^\bullet$ y $\text{Cl}_2\text{CHO}^\bullet$).^[99,100] Las especies reparadoras se han seleccionado de acuerdo a su concentración a pH fisiológico: H_2Ur^- , HAsc^- , GSH^- y HTx^- . Para el H_2Ur^- se ha seleccionado el sitio de reacción NH 3 porque corresponde a la reacción con el valor de ΔG_{rx} más favorable (-14.88 kcal/mol, tabla 6.34) y, por lo tanto, debe presentar la menor energía de activación (principio de Bell–Evans–Polanyi).^[134,192]

En las figuras 6.43, 6.44, 6.45 y 6.46 se presentan los perfiles de evolución de cargas NPA y densidades de espín de Hirshfeld, en función de la coordenada de reacción, para la reacción del radical en C_γ con el H_2Ur^- , HAsc^- , GSH^- y HTx^- respectivamente. La primera diferencia que se observa con respecto al mecanismo PCET, es la carga sobre el núcleo en transferencia. Para HAT, la carga es menor en comparación a PCET. Para la reacción con H_2Ur^- y GSH^- , la carga sobre el núcleo transferido es $\sim 0.2e$. Para la reacción con HAsc^- y HTx^- , inicialmente es $\sim 0.5e$ y decae a $\sim 0.3e$ durante el proceso de transferencia. A la geometría de los TS, la carga sobre el núcleo transferido es $\sim 0.2e$ para la reacción con H_2Ur^- y GSH^- , y $\sim 0.4e$ para la reacción con HAsc^- y HTx^- . Las densidades de espín presentan un comportamiento diferente al observado para el mecanismo PCET. Para la reacción con H_2Ur^- , al inicio de la región estudiada (coordenada de reacción igual a -0.5), la densidad de espín sobre el núcleo transferido es 0.097 y decae gradualmente hasta a 0.020 (coordenada de reacción igual a 0.5) a medida que evoluciona hacia productos. Para la reacción con HAsc^- y HTx^- , las densidades de espín sobre los núcleos en transferencia son, inicialmente, 0.075 y 0.073, respectivamente, y decaen a 0.018 y 0.016 a medida que avanza la reacción. Y, finalmente, para la reacción con GSH^- , la densidad de espín sobre el núcleo en transferencia tiene un valor de 0.060 al inicio de la región estudiada, y decae a un valor de 0.053 a medida que el sistema evoluciona hacia productos. A la geometría de los TS, las densidades de espín sobre el núcleo transferido son 0.080, 0.074 y 0.072 para la reacción con H_2Ur^- , HAsc^- y GSH^- , respectivamente. Por lo tanto, la densidad de espín sobre el núcleo en transferencia es mayor, aproximadamente, por un orden de magnitud en comparación al mecanismo PCET. Nótese que, la decaída de la densidad de espín sobre el núcleo transferido en la región de productos, es consecuencia de la formación del enlace covalente con el radical de Leu, comportamiento que se observa para las tres reacciones estudiadas. Al igual que en las reacciones PCET, para las reacciones de reparación con el H_2Ur^- , HAsc^- y HTx^- , los orbitales HOMO y SOMO se encuentran deslocalizados en la geometría del TS. El orbital HOMO para la reacción con el GSH^- es una excepción, encontrándose que, para esa especie, el orbital corresponde a un par libre del átomo de azufre. Sin embargo, el orbital SOMO presenta el comportamiento esperado.

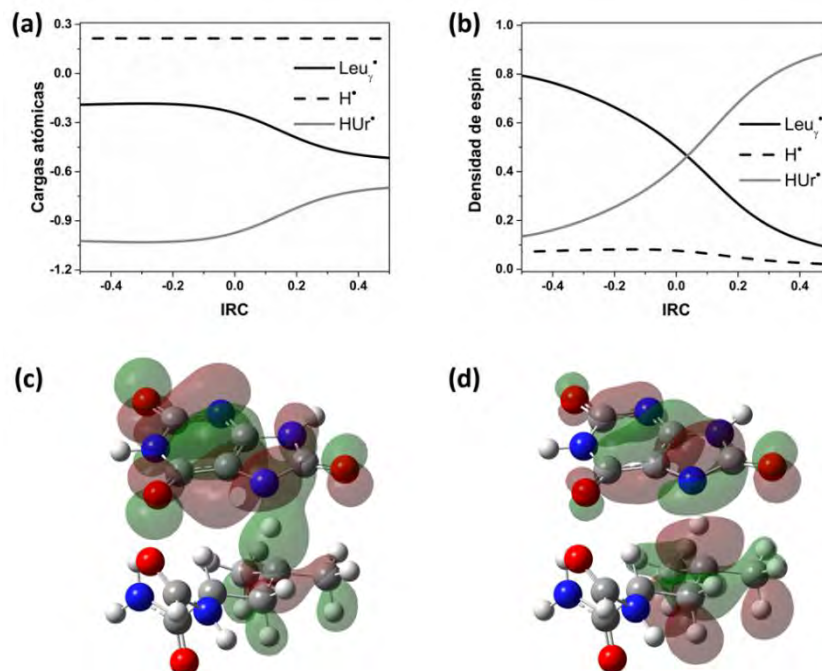


Figura 6.43. Reparación entre el radical $\text{Leu}_\gamma^\bullet$ y H_2Ur^- (NH 3). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

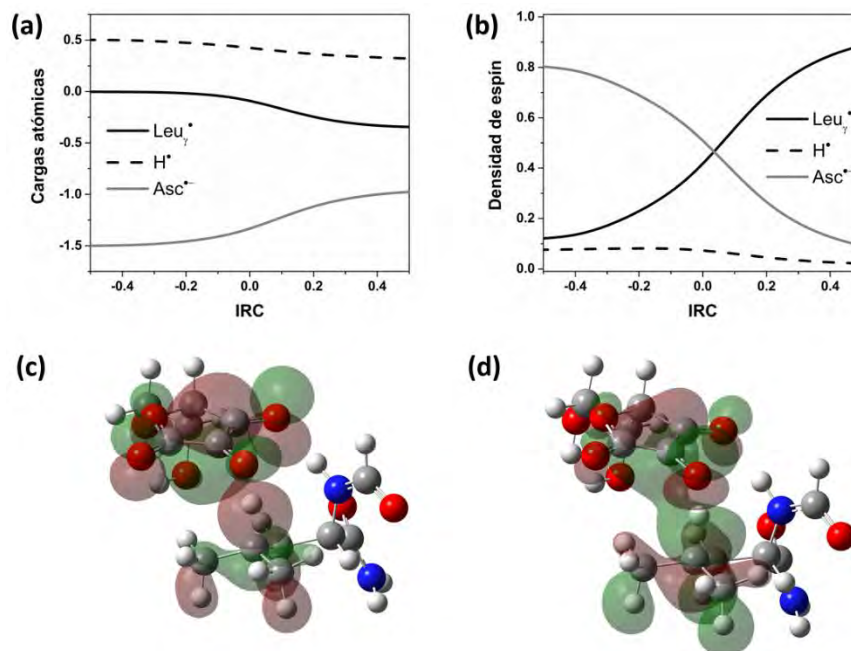


Figura 6.44. Reacción de reparación entre el radical $\text{Leu}_\gamma^\bullet$ y HAsc^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

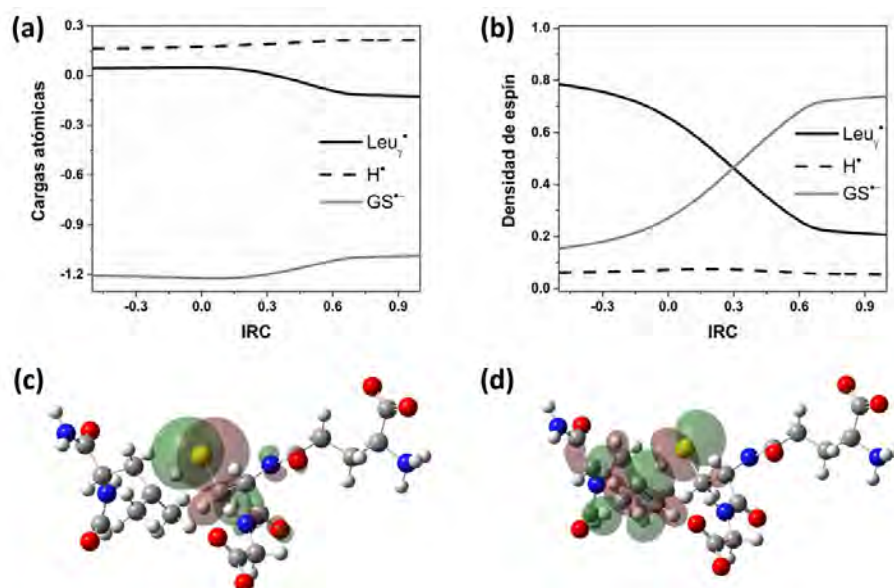


Figura 6.45. Reacción de reparación entre el radical $\text{Leu}_\gamma^\bullet$ y GSH^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

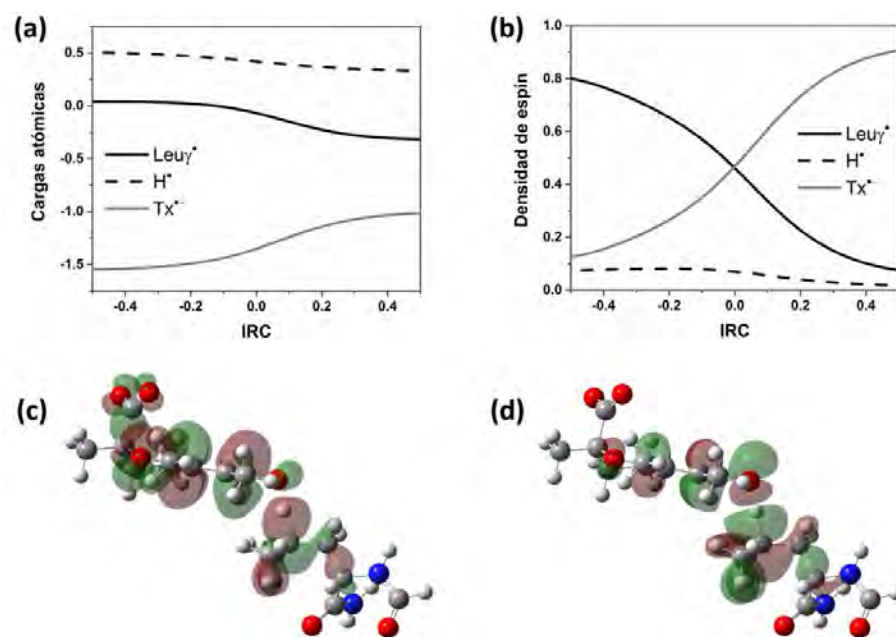


Figura 6.46. Reacción de reparación entre el radical $\text{Leu}_\gamma^\bullet$ y HTx^- . Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

Al observar la evolución de densidad de espín en las figuras 6.43, 6.44, 6.45 y 6.46, el hecho de que la inversión de espín entre el aceptor y donador no ocurre a la geometría del TS, podría asociarse, de forma equivocada, con alguna asincronía para la transferencia del H^+ y e^- . En las reacciones HAT, tal corrimiento del punto de cruce debe ser asociado con la ruptura y formación del enlace covalente.

La reparación de radicales de Leu por las fracciones neutras del ácido úrico (H_3Ur), ácido ascórbico (H_2Asc) y trolox (H_2Tx), se estudiaron en pentiletanoato. Para el H_3Ur , la reacción con el sitio NH 2 corresponden a las más exergónicas (tabla 6.35). Por lo tanto, se han calculado los TS para la reparación de los cuatro radicales de Leu (C_α , C_β , C_γ y C_δ) por el sitio de reacción NH 2 del H_3Ur , i.e., cuatro TS. Las energías de activación para tales TS son altas ($\Delta G^\ddagger > 19.0$ kcal/mol, tabla 6.37), razón por la cual no se realizaron los cálculos para los radicales y posiciones NH restantes, i.e., de acuerdo al principio de Bell–Evans–Polanyi las energías de activación no calculadas, deben ser mayores que aquellas para la reacción entre los radicales de Leu y el sitio de reacción NH 2 del H_3Ur .^[134,192] El análisis mecanístico en pentiletanoato, indica que la reacción ocurre a través de un mecanismo HAT, igual que los resultados obtenidos en medio acuoso.

Para la reparación por el H_2Asc en pentiletanoato, se ha determinado que las energías de activación de todas las reacciones viables termodinámicamente (tabla 6.39) son altas ($\Delta G^\ddagger > 13.0$ kcal/mol, tabla 6.41). El mecanismo de reacción en pentiletanoato es HAT, al igual que en medio acuoso.

Finalmente, para las reacciones de reparación con el H_2Tx en pentiletanoato, al igual que para la fracción H_2Asc , se encontraron energías de activación son relativamente altas ($\Delta G^\ddagger > 13.0$ kcal/mol, tabla 6.47). El análisis de cargas y densidades de espín indicaron que el mecanismo de reacción se conserva al pasar de medio acuoso a medio lipídico, i.e., el mecanismo de reparación es HAT.

7. Reparación de radicales libres de ácidos grasos.

Los ácidos grasos son constituyentes fundamentales de los fosfolípidos en las membranas celulares. Cuando los ácidos grasos contienen más de un enlace doble C-C en su estructura, se denominan ácidos grasos polinsaturados (AGPI). La presencia de enlaces dobles C-C, convierte a los AGPI en especies susceptibles a experimentar procesos de oxidación mediados por radicales libres. AGPI que contienen grupos bis-alílicos, son los principales blancos de la peroxidación lipídica (sección 2.3, capítulo 2). La peroxidación lipídica inicia por la abstracción de los átomos H• de las posiciones bis-alílicas (etapa de iniciación). Una vez se oxidan los AGPI, ocurre la adición de $^3\text{O}_2$, dando origen a la formación de los correspondientes radicales peroxilo, los cuales pueden oxidar a otros AGPI mediante la abstracción de otros átomos H• de las posiciones bis-alílicas (etapa de propagación). La reparación química de AGPI, debe evitar la adición de $^3\text{O}_2$ y, de esta forma, prevenir la etapa de propagación de la peroxidación lipídica.

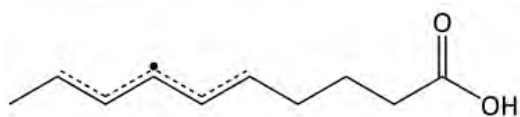
En la tabla 7.1, se presentan los valores de energías libres y entalpías de reacción (ΔG_{rx} y ΔG_{rx} , respetivamente) para reacciones de reparación de un modelo de daño de AGPI, el ácido deca-5,8-dienoico (esquema 7.1), con 13 compuestos antioxidantes, en pentiletanoato. Las reacciones de reparación estudiadas corresponden a transferencias formales de hidrógeno desde los compuestos antioxidantes hacia el modelo de daño, donde se consideró únicamente las reacciones que restauran el ácido graso, i.e., la transferencia de un H• al átomo de carbono bis-alílico.

De los 13 compuestos considerados, 10 son flavonoides, 2 estilbenoides (resveratrol y mercaptoestilbeno) y el retinol (vitamina A1). Para los flavonoides, las posiciones reactivas consideradas en este trabajo, son todos los grupos OH en la estructura. Para el resveratrol y mercaptoestilbeno, se consideró la transferencia desde los grupos OH y SH, respectivamente. Y para el retinol, se consideró la transferencia desde el grupo CH₃ que da origen a la formación del radical libre con mayor grado de deslocalización electrónica (señalado en el esquema 7.1). Las estructuras de los antioxidantes estudiados, se presentan en el esquema 7.1.

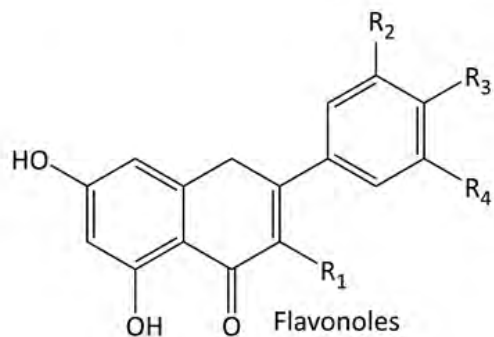
Los resultados en la tabla 7.1 indican que la reparación química del daño ocasionado por radicales libres a los residuos de AGPI en membranas celulares, tiene baja probabilidad de ocurrir. Todas las reacciones consideradas son endergónicas. El mercaptoestilbeno presenta el valor de ΔG_{rx} menos endergónico (4.47 kcal/mol), y su estructura puede utilizarse como punto de partida para el diseño de compuestos antioxidantes enfocados a la reparación del daño ocasionado por radicales libres a AGPI en las membranas celulares y evitar la etapa de propagación de la peroxidación lipídica.

Tabla 7.1. Viabilidad termodinámica (ΔG_{rx} y ΔH_{rx} , kcal/mol) de las reacciones de reparación del daño oxidativo del ácido deca-5,8-dienoico por diferentes compuestos antioxidantes.

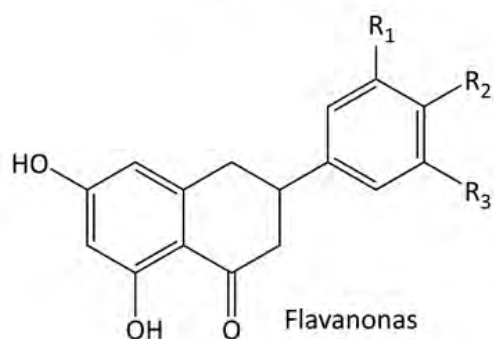
| Reparador | OH | ΔG_{rx} | ΔH_{rx} |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Apigenina | 1 | 16.14 | 17.18 |
| | 2 | 30.03 | 31.28 |
| | 3 | 21.61 | 22.14 |
| Eriodictiol | 1 | 9.49 | 9.02 |
| | 2 | 9.28 | 8.63 |
| | 3 | 28.35 | 29.61 |
| | 4 | 50.98 | 50.79 |
| Galangina | 1 | 12.94 | 14.02 |
| | 2 | 26.68 | 27.70 |
| | 3 | 22.24 | 22.35 |
| Hesperetina | 1 | 14.50 | 14.96 |
| | 2 | 28.69 | 29.83 |
| | 3 | 48.07 | 47.88 |
| Isorhamnetina | 1 | 11.33 | 12.03 |
| | 2 | 13.15 | 13.80 |
| | 3 | 26.87 | 27.66 |
| | 4 | 22.52 | 21.33 |
| Kaempferol | 1 | 11.92 | 12.70 |
| | 2 | 14.37 | 15.04 |
| | 3 | 27.57 | 28.02 |
| | 4 | 21.45 | 21.70 |
| Luteolina | 1 | 10.59 | 10.51 |
| | 2 | 9.62 | 9.75 |
| | 3 | 29.82 | 31.40 |
| | 4 | 21.57 | 22.20 |
| Miricetina | 1 | 12.23 | 13.24 |
| | 2 | 10.81 | 11.36 |
| | 3 | 8.16 | 8.15 |
| | 4 | 16.58 | 16.73 |
| | 5 | 27.01 | 27.96 |
| | 6 | 21.67 | 21.98 |
| Naringenina | 1 | 17.40 | 15.51 |
| | 2 | 29.23 | 29.86 |
| | 3 | 22.91 | 23.30 |
| Quercetina | 1 | 11.97 | 12.86 |
| | 2 | 9.65 | 9.78 |
| | 3 | 8.14 | 8.16 |
| | 4 | 26.86 | 27.86 |
| | 5 | 21.25 | 21.80 |
| Resveratrol | 1 | 11.89 | 11.12 |
| | 2 | 16.07 | 15.82 |
| Mercaptoestilbeno | SH | 4.47 | 3.20 |
| Retinol | CH ₃ | 7.94 | 7.21 |



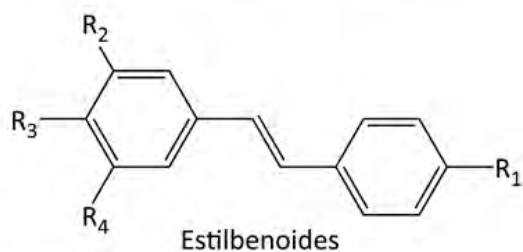
Radical del ácido deca-5,8-dienoico



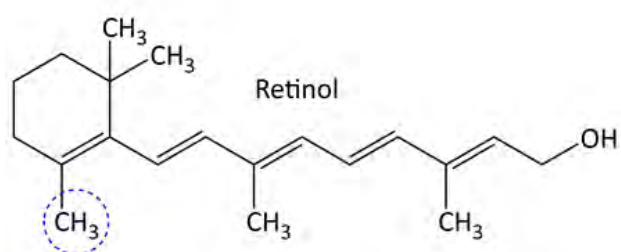
| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|---------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| Apigenina | H | H | OH | H |
| Galangina | OH | H | H | H |
| Isorhamnetina | OH | H | OH | OCH ₃ |
| Kaempferol | OH | H | OH | H |
| Luteolina | H | OH | OH | H |
| Miricetina | OH | OH | OH | OH |
| Quercetina | OH | OH | OH | H |



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------|----------------|------------------|----------------|
| Eriodictiol | OH | OH | H |
| Hesperetina | OH | OCH ₃ | H |
| Naringenina | H | OH | H |



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Resveratrol | OH | OH | H | OH |
| Mercaptoestilbeno | SH | H | SH | H |



Esquema 7.1. Modelo de daño de ácido graso y reparadores estudiados.

8. Conclusiones.

La metodología QM-ORSA, en conjunto con el análisis mecanístico con base en la evolución de cargas y densidades de espín, demostró ser una herramienta de gran utilidad en la determinación de los mecanismos de reparación de los aminoácidos triptófano, tirosina y leucina, por los antioxidantes de relevancia biológica ácido úrico, ácido ascórbico, glutatión, trolox, e inclusive el anión radical superóxido.

Los resultados presentados en este trabajo, comprenden el primer ejemplo de los mecanismos secuenciales de transferencia de protón-electrón (PEST), transferencia de electrón-protón (EPST) y ganancia de protón-transferencia electrónica (SPGET), los cuales permitieron explicar diversas observaciones experimentales asociadas a sistemas biológicos complejos. Las especies que participan en dichos mecanismos, no corresponden a las fracciones mayoritarias de los reactivos, resultado que demuestra la necesidad de considerar las diferentes fracciones de especies químicas generadas por equilibrios ácido-base en medio acuoso.

La actividad reparadora del ácido úrico hacia radicales de triptófano, ocurre a través de los mecanismos secuenciales PEST (radical neutro de triptófano y fracción completamente protonada del ácido úrico) y SPGET (catión radical de triptófano y fracción mono-aniónica de ácido úrico), dando cuenta de más del 99% del valor de la constante de velocidad reportada experimentalmente para modelos de daño de triptófano a pH fisiológico. Los mecanismos PEST y SPGET pueden ocurrir más rápidamente a valores de pH ácidos. El mecanismo PEST es activo en medio lipídico, lo que indica que la reparación de triptófano probablemente puede ocurrir en la membrana celular y cavidades hidrofóbicas de proteínas.

La actividad reparadora del ácido ascórbico hacia radicales de triptófano, pudo ser explicada por la reacción entre las fracciones mayoritarias de reactivos (radical neutro de triptófano y fracción mono-aniónica del ácido ascórbico) a través del mecanismo concertado de transferencia de protón-acoplada a la transferencia de electrón (PCET). Los mecanismos PEST (radical neutro de triptófano y fracción protonada del ácido ascórbico) y SPGET (catión radical de triptófano y fracción mono-aniónica del ácido ascórbico), cobran importancia a valores de pH inferiores al fisiológico.

El mecanismo de reacción PEST (radical neutro de triptófano y fracción mono-aniónica del glutatión) y SPGET (catión radical de triptófano y fracción di-aniónica del glutatión) mostró ser activo para la reacción de reparación de radicales de triptófano mediada por el glutatión, reacciones que ocurren a velocidades lo suficientemente altas como para evitar la adición de oxígeno molecular (segunda

etapa de daño) y evitar la transferencia del daño desde residuos de triptófano a residuos de tirosina en proteínas.

El trolox repara a los radicales de triptófano a través de dos mecanismos de reacción: PCET (radical neutro de triptófano y fracción mono-aniónica del trolox) y transferencia electrónica (catión radical de triptófano y fracción mono-aniónica del trolox). Las constantes de velocidad de esos dos mecanismos dan cuenta de más del 99% de la constante de velocidad total calculada en este trabajo.

El anión radical superóxido puede reparar radicales de triptófano a través de tres mecanismos de reacción que dan origen a la formación del aminoácido reparado y oxígeno triplete: PEST (radical neutro de triptófano y radical hidroperoxilo), SPGET (catión radical de triptófano y anión radical superóxido) y transferencia electrónica (radical neutro de triptófano y anión radical superóxido). La reacción de transferencia electrónica da cuenta por más del 94% de la constante de velocidad total calculada en este trabajo. Sin embargo, los mecanismos PEST y SPGET cobran importancia a valores de pH inferiores al fisiológico.

La reparación del radical neutro de tirosina por el ácido úrico, ocurre a través de un mecanismo PCET mediado por la fracción mono-aniónica del reparador, reacción que da cuenta por más del 90% de la constante de velocidad calculada en este trabajo. La fracción di-aniónica repara al radical de tirosina a través de dos mecanismos de reacción: EPST y transferencia electrónica. Juntos, corresponden al ~9% de la constante de velocidad total y, por lo tanto, deben ser considerados.

La reparación del radical neutro de tirosina por el ácido ascórbico y trolox, ocurre a través de un mecanismo concertado PCET, donde las fracciones mono-aniónicas de los reparadores corresponden a las especies reductoras. La velocidad de las reacciones PCET, para los dos sistemas, ocurre a velocidades controladas por la difusión.

El anión radical superóxido y el radical hidroperoxilo pueden reparar al radical neutro de tirosina a través de un mecanismo de transferencia electrónica y un mecanismo PCET, respectivamente, procesos que dan origen a la formación del aminoácido reducido y el oxígeno triplete. A pH fisiológico, la reacción de transferencia electrónica corresponde a la principal vía de reparación, y a pH inferiores a 6, el mecanismo PCET cobra importancia.

Las interacciones π - π *stacking* entre reactivos en la geometría de estado de transición, abre un canal de transferencia electrónica que permite que el electrón y protón que conforman un átomo de hidrógeno se transfieran de forma simultánea a través de un mecanismo de reacción PCET

adiabático, y por lo tanto, la variación de cargas y espín a través de la coordenada de reacción ocurre de forma gradual, y no de forma súbita como ocurre para la reacción de intercambio de hidrógeno entre el radical fenoxilo y el fenol, modelo clásico de PCET.

La reparación de los radicales de leucina ocurre a través de mecanismos de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT), independiente del antioxidante. De los reparadores estudiados, el ácido ascórbico y glutatión mostraron ser los únicos reparadores eficientes de radicales en leucina, con velocidades de reacción cercanas al límite por difusión.

El daño ocasionado por radicales libres a los ácidos grasos en las membranas celulares, es irreparable por la acción de los antioxidantes considerados en este trabajo. Todas las reacciones estudiadas mostraron ser endergónicas, y por lo tanto reversibles.

Los resultados obtenidos en este trabajo, revelan la importancia de considerar todas las especies presentes en el medio de reacción con el fin de explicar datos cinéticos experimentales. Adicionalmente, proporcionan información mecanística útil para el desarrollo de compuestos antioxidantes sintéticos enfocados a reparar el daño por estrés oxidativo de amino ácidos en proteínas.

9. Referencias.

1. H. van de Waterbeemd, R. E. Carter, G. Grassy, H. Kubinyi, Y. C. Martin, M. S. Tute y P. Willett, *Glossary of terms used in computational drug design (IUPAC Recommendations 1997)*, in *Pure and Applied Chemistry*. 1997. p. 1137.
2. F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry*. 2007: Wiley.
3. F. X. Coudert, *Reproducible Research in Computational Chemistry of Materials*. Chemistry of Materials, 2017. **29**(7): p. 2615-2617.
4. V. Tsui, D. F. Ortwine y J. M. Blaney, *Enabling drug discovery project decisions with integrated computational chemistry and informatics*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2017. **31**(3): p. 287-291.
5. J. M. Skelton, E. L. da Silva, R. Crespo-Otero, L. E. Hatcher, P. R. Raithby, S. C. Parker y A. Walsh, *Electronic excitations in molecular solids: bridging theory and experiment*. Faraday Discussions, 2015. **177**: p. 181-202.
6. J. Li, P. C. Wen, M. Moradi y E. Tajkhorshid, *Computational characterization of structural dynamics underlying function in active membrane transporters*. Current Opinion in Structural Biology, 2015. **31**: p. 96-105.
7. E. Soriano y I. Fernandez, *Allenes and computational chemistry: from bonding situations to reaction mechanisms*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(9): p. 3041-3105.
8. D. J. Tantillo, *Faster, Catalyst! React! React! Exploiting Computational Chemistry for Catalyst Development and Design*. Accounts of Chemical Research, 2016. **49**(6): p. 1079-1079.
9. T. Sperger, I. A. Sanhueza y F. Schoenebeck, *Computation and Experiment: A Powerful Combination to Understand and Predict Reactivities*. Accounts of Chemical Research, 2016. **49**(6): p. 1311-1319.
10. Z. H. Yang, S. Luo, Z. S. Wei, T. T. Ye, R. C. Spinney, D. Chen y R. Y. Xiao, *Rate constants of hydroxyl radical oxidation of polychlorinated biphenyls in the gas phase: A single-descriptor based QSAR and DFT study*. Environmental Pollution, 2016. **211**: p. 157-164.
11. M. J. Al Rashidi, S. Thion, C. Togbe, G. Dayma, M. Mehl, P. Dagaut, W. J. Pitz, J. Zador y S. M. Sarathy, *Elucidating reactivity regimes in cyclopentane oxidation: Jet stirred reactor experiments, computational chemistry, and kinetic modeling*. Proceedings of the Combustion Institute, 2017. **36**(1): p. 469-477.
12. C. J. Cramer, *Essentials of computational chemistry : theories and models*. 2nd ed. 2004, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: Wiley. xx, 596 p.

13. E. Lewars, *Computational chemistry : introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*. 2nd ed. 2011, Dordrecht Netherlands ; London ; New York: Springer. xvi, 664 p.
14. I. N. Levine, *Quantum chemistry*. Seventh edition. ed. 2014, Boston: Pearson. 700 pages.
15. A. Galano y J. R. Alvarez-Idaboy, *A Computational Methodology for Accurate Predictions of Rate Constants in Solution: Application to the Assessment of Primary Antioxidant Activity*. *Journal of Computational Chemistry*, 2013. **34**(28): p. 2430-2445.
16. J. R. Alvarez-Idaboy y A. Galano, *On the Chemical Repair of DNA Radicals by Glutathione: Hydrogen vs Electron Transfer*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2012. **116**(31): p. 9316-9325.
17. R. Castaneda-Arriaga, A. Dominguez-Castro, J. Lee, J. R. Alvarez-Idaboy y N. Mora-Diez, *Chemical repair of protein carbon-centred radicals: long-distance dynamic factors*. *Canadian Journal of Chemistry*, 2016. **94**(12): p. 1119-1126.
18. R. H. Bisby, S. Ahmed y R. B. Cundall, *Repair of Amino-Acid Radicals by a Vitamin-E Analog*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984. **119**(1): p. 245-251.
19. B. M. Hoey y J. Butler, *The Repair of Oxidized Amino-Acids by Antioxidants*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1984. **791**(2): p. 212-218.
20. S. V. Jovanovic y M. G. Simic, *Repair of tryptophan radicals by antioxidants*. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1985. **1**(2): p. 125-129.
21. M. J. Davies, L. G. Forni y R. L. Willson, *Vitamin-E Analog Trolox-C - Electron-Spin-Resonance and Pulse-Radiolysis Studies of Free-Radical Reactions*. *Biochemical Journal*, 1988. **255**(2): p. 513-522.
22. T. Nauser, W. H. Koppenol y J. M. Gebicki, *The kinetics of oxidation of GSH by protein radicals*. *Biochemical Journal*, 2005. **392**: p. 693-701.
23. A. S. Domazou, W. H. Koppenol y J. M. Gebicki, *Efficient repair of protein radicals by ascorbate*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009. **46**(8): p. 1049-1057.
24. J. M. Gebicki, T. Nauser, A. Domazou, D. Steinmann, P. L. Bounds y W. H. Koppenol, *Reduction of protein radicals by GSH and ascorbate: potential biological significance*. *Amino Acids*, 2010. **39**(5): p. 1131-1137.
25. L. K. Folkes, M. Trujillo, S. Bartesaghi, R. Radi y P. Wardman, *Kinetics of reduction of tyrosine phenoxyl radicals by glutathione*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011. **506**(2): p. 242-249.
26. A. S. Domazou, H. Zhu y W. H. Koppenol, *Fast repair of protein radicals by urate*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **52**(9): p. 1929-36.

27. A. S. Domazou, J. M. Gebicki, T. Nauser y W. H. Koppenol, *Repair of Protein Radicals by Antioxidants*. Israel Journal of Chemistry, 2014. **54**(3): p. 254-264.
28. A. Favier, *Analysis of free radicals in biological systems / edited by A. E. Favier ... [et al.]*. 1995, Basel ; Boston: Birkhäuser Verlag. x, 312 p.
29. F. A. Villamena, *Chemistry of Reactive Species, in Molecular Basis of Oxidative Stress*. 2013, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-48.
30. R. j. Gelpi, *Biochemistry of oxidative stress : physiopathology and clinical aspects*. 2016, New York, NY: Springer Berlin Heidelberg. pages cm.
31. B. C. Dickinson y C. J. Chang, *Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses*. Nature Chemical Biology, 2011. **7**(8): p. 504-511.
32. R. P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. J. Jo, B. A. Freeman y V. M. Darley-Usmar, *Biological aspects of reactive nitrogen species*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 1999. **1411**(2-3): p. 385-400.
33. M. C. H. Gruhlke y A. J. Slusarenko, *The biology of reactive sulfur species (RSS)*. Plant Physiology and Biochemistry, 2012. **59**: p. 98-107.
34. A. Phaniendra, D. B. Jestadi y L. Periyasamy, *Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2015. **30**(1): p. 11-26.
35. J. M. MatÉs, C. Pérez-Gómez y I. N. De Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clinical Biochemistry, 1999. **32**(8): p. 595-603.
36. K. Briviba y H. Sies, *4 - Nonenzymatic Antioxidant Defense Systems A2 - Frei, Balz, in Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. 1994, Academic Press: San Diego. p. 107-128.
37. R. A. Jacob y G. Sotoudeh, *Vitamin C Function and Status in Chronic Disease*. Nutrition in Clinical Care, 2002. **5**(2): p. 66-74.
38. D. M. Townsend, K. D. Tew y H. Tapiero, *The importance of glutathione in human disease*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2003. **57**(3-4): p. 145-155.
39. D. Gackowski, J. Kowalewski, A. Siomek y R. Olinski, *Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: Comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers*. International Journal of Cancer, 2005. **114**(1): p. 153-156.
40. N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. J. Shi, K. Tieu y C. L. Hammond, *Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases*. Biological Chemistry, 2009. **390**(3): p. 191-214.

41. V. Calabrese, C. Cornelius, V. Leso, A. Trovato-Salinaro, B. Ventimiglia, M. Cavallaro, M. Scuto, S. Rizza, L. Zanolli, S. Neri y P. Castellino, *Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2012. **1822**(5): p. 729-736.
42. S. Ramadan, A. Tawdy, R. A. Hay, L. Rashed y D. Tawfik, *The Antioxidant Role of Paraoxonase 1 and Vitamin E in Three Autoimmune Diseases*. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2013. **26**(1): p. 2-7.
43. E. Fabbrini, M. Serafini, I. C. Baric, S. L. Hazen y S. Klein, *Effect of Plasma Uric Acid on Antioxidant Capacity, Oxidative Stress, and Insulin Sensitivity in Obese Subjects*. *Diabetes*, 2014. **63**(3): p. 976-981.
44. M. G. Weisskopf, E. O'Reilly, H. Chen, M. A. Schwarzschild y A. Ascherio, *Plasma Urate and Risk of Parkinson's Disease*. *American Journal of Epidemiology*, 2007. **166**(5): p. 561-567.
45. X. Gao, E. J. O'Reilly, M. A. Schwarzschild y A. Ascherio, *Prospective study of plasma urate and risk of Parkinson disease in men and women*. *Neurology*, 2016. **86**(6): p. 520-526.
46. J. M. Rifkind, E. Nagababu, S. Ramasamy y L. B. Ravi, *Hemoglobin redox reactions and oxidative stress*. *Redox Report*, 2003. **8**(5): p. 234-237.
47. J. M. Rifkind, S. Ramasamy, P. T. Manoharan, E. Nagababu y J. G. Mohanty, *Redox reactions of hemoglobin*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2004. **6**(3): p. 657-666.
48. E. Cadenas y K. J. A. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. **29**(3-4): p. 222-230.
49. A. D. N. J. De Grey, *HO₂[•]: The Forgotten Radical*. *DNA and Cell Biology*, 2002. **21**(4): p. 251-257.
50. Y. W. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A. F. Miller, M. Teixeira y J. S. Valentine, *Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases*. *Chemical Reviews*, 2014. **114**(7): p. 3854-3918.
51. H. J. H. Fenton, *LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron*. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 1894. **65**(0): p. 899-910.
52. F. Haber y J. Weiss, *The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences*, 1934. **147**(861): p. 332.
53. C. C. Winterbourn y A. J. Kettle, *Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. **29**(5): p. 403-409.

54. J. M. Albrich, C. A. McCarthy y J. K. Hurst, *Biological Reactivity of Hypochlorous Acid - Implications for Microbicidal Mechanisms of Leukocyte Myeloperoxidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1981. **78**(1): p. 210-214.
55. C. C. Winterbourn, *Comparative Reactivities of Various Biological Compounds with Myeloperoxidase Hydrogen Peroxide-Chloride, and Similarity of the Oxidant to Hypochlorite*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1985. **840**(2): p. 204-210.
56. W. A. Prutz, *Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **332**(1): p. 110-120.
57. D. A. Ford, *Lipid oxidation by hypochlorous acid: chlorinated lipids in atherosclerosis and myocardial ischemia*. Clinical Lipidology, 2010. **5**(6): p. 835-852.
58. N. R. Stanley, D. I. Pattison y C. L. Hawkins, *Ability of Hypochlorous Acid and N-Chloramines to Chlorinate DNA and Its Constituents*. Chemical Research in Toxicology, 2010. **23**(7): p. 1293-1302.
59. G. Colombo, M. Clerici, A. Altomare, F. Rusconi, D. Giustarini, N. Portinaro, M. L. Garavaglia, R. Rossi, I. Dalle-Donne y A. Milzani, *Thiol oxidation and di-tyrosine formation in human plasma proteins induced by inflammatory concentrations of hypochlorous acid*. Journal of Proteomics, 2017. **152**: p. 22-32.
60. M. B. Hampton, A. J. Kettle y C. C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-3017.
61. M. J. Davies, *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. **305**(3): p. 761-770.
62. M. Gracanin, C. L. Hawkins, D. I. Pattison y M. J. Davies, *Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **47**(1): p. 92-102.
63. L. F. Agnez-Lima, J. T. A. Melo, A. E. Silva, A. H. S. Oliveira, A. R. S. Timoteo, K. M. Lima-Bessa, G. R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, R. S. Galhardo y C. F. M. Menck, *DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms*. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 2012. **751**(1): p. 15-28.
64. C. C. Wei, B. R. Crane y D. J. Stuehr, *Tetrahydrobiopterin radical enzymology*. Chemical Reviews, 2003. **103**(6): p. 2365-2383.
65. K. M. Robinson y J. S. Beckman, *Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide*. Nitric Oxide, Pt E, 2005. **396**: p. 207-214.

66. S. V. Lymar y J. K. Hurst, *Rapid Reaction between Peroxonitrite Ion and Carbon-Dioxide - Implications for Biological-Activity*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(34): p. 8867-8868.
67. D. I. Pattison, A. S. Rahmanto y M. J. Davies, *Photo-oxidation of proteins*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2012. **11**(1): p. 38-53.
68. M. J. Davies, *Protein oxidation and peroxidation*. Biochemical Journal, 2016. **473**: p. 805-825.
69. E. S. J. Arner y A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(20): p. 6102-6109.
70. S. Gromer, S. Urig y K. Becker, *The thioredoxin system - From science to clinic*. Medicinal Research Reviews, 2004. **24**(1): p. 40-89.
71. J. Moskovitz, *Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2005. **1703**(2): p. 213-219.
72. H. Y. Kim, *The Methionine Sulfoxide Reduction System: Selenium Utilization and Methionine Sulfoxide Reductase Enzymes and Their Functions*. Antioxidants & Redox Signaling, 2013. **19**(9): p. 958-969.
73. B. S. Berlett y E. R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(33): p. 20313-20316.
74. M. J. Davies y R. T. Dean, *Radical-mediated Protein Oxidation: From Chemistry to Medicine*. Oxford science publications. 1997: Oxford University Press.
75. M. J. Davies, S. L. Fu, H. J. Wang y R. T. Dean, *Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(11-12): p. 1151-1163.
76. T. Grune, T. Jung, K. Merker y K. J. A. Davies, *Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(12): p. 2519-2530.
77. R. Radi, *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(12): p. 4003-4008.
78. I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini y A. Milzani, *Biomarkers of oxidative damage in human disease*. Clinical Chemistry, 2006. **52**(4): p. 601-623.
79. R. A. Dunlop, U. T. Brunk y K. J. Rodgers, *Oxidized Proteins: Mechanisms of Removal and Consequences of Accumulation*. Iubmb Life, 2009. **61**(5): p. 522-527.

80. L. Muñoz-Rugeles y J. R. Alvarez-Idaboy, *A proton-electron sequential transfer mechanism: theoretical evidence about its biological relevance*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015. **17**(43): p. 28525-28528.
81. A. Perez-Gonzalez, L. Munoz-Rugeles y J. R. Alvarez-Idaboy, *Tryptophan versus nitric oxide, nitrogen dioxide and carbonate radicals: differences in reactivity and implications for oxidative damage to proteins*. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2016. **135**(6), p. 155.
82. H. D. Connor, B. E. Sturgeon, C. Mottley, H. J. Sipe y R. P. Mason, *L-Tryptophan Radical Cation Electron Spin Resonance Studies: Connecting Solution-Derived Hyperfine Coupling Constants with Protein Spectral Interpretations*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(20): p. 6381-6387.
83. S. Stoll, H. S. Shafaat, J. Krzystek, A. Ozarowski, M. J. Tauber, J. E. Kim y R. D. Britt, *Hydrogen Bonding of Tryptophan Radicals Revealed by EPR at 700 GHz*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(45): p. 18098-18101.
84. M. T. Zhang y L. Hammarstrom, *Proton-Coupled Electron Transfer from Tryptophan: A Concerted Mechanism with Water as Proton Acceptor*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(23): p. 8806-8809.
85. H. Zhang, C. Andrekopoulos, J. Joseph, J. Crow y B. Kalyanaraman, *The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and alpha-synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004. **36**(11): p. 1355-1365.
86. H. Zhang, J. Joseph, J. Crow y B. Kalyanaraman, *Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu, Zn superoxide dismutase*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004. **37**(12): p. 2018-2026.
87. D. B. Medinas, F. C. Gozzo, L. F. A. Santos, A. H. Iglesias y O. Augusto, *A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010. **49**(6): p. 1046-1053.
88. V. Paviani, R. F. Queiroz, E. F. Marques, P. Di Mascio y O. Augusto, *Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015. **89**: p. 72-82.

89. W. T. Dixon y D. Murphy, *Determination of Acidity Constants of Some Phenol Radical Cations by Means of Electron-Spin Resonance*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1976. **72**: p. 1221-1230.
90. W. T. Dixon y D. Murphy, *Determination of Acid Dissociation-Constants of Some Phenol Radical Cations*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1978. **74**: p. 432-439.
91. D. M. Holton y D. Murphy, *Determination of Acid Dissociation-Constants of Some Phenol Radical Cations* .2. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1979. **75**: p. 1637-1642.
92. S. Steenken y P. Neta, *Electron-Transfer Rates and Equilibria between Substituted Phenoxide Ions and Phenoxy Radicals*. Journal of Physical Chemistry, 1979. **83**(9): p. 1134-1137.
93. Z. Rappoport, *The Chemistry of Phenols, 2 Volume Set*. 2004: Wiley.
94. H. R. Lucas, S. DeBeer, M. S. Hong y J. C. Lee, *Evidence for Copper-dioxygen Reactivity during alpha-Synuclein Fibril Formation*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(19): p. 6636-6637.
95. C. D. Borsarelli, L. J. Falomir-Lockhart, V. Ostatna, J. A. Fauerbach, H. H. Hsiao, H. Urlaub, E. Palecek, E. A. Jares-Erijman y T. M. Jovin, *Biophysical properties and cellular toxicity of covalent crosslinked oligomers of alpha-synuclein formed by photoinduced side-chain tyrosyl radicals*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(4): p. 1004-1015.
96. B. R. Roberts, T. M. Ryan, A. I. Bush, C. L. Masters y J. A. Duce, *The role of metallobiology and amyloid-ss peptides in Alzheimer's disease*. Journal of Neurochemistry, 2012. **120**: p. 149-166.
97. S. C. Drew, W. M. Kok, C. A. Hutton y K. J. Barnham, *Cu²⁺ Coordination of Covalently Cross-linked beta-Amyloid Dimers*. Applied Magnetic Resonance, 2013. **44**(8): p. 927-939.
98. S. Fu, M. J. Davies, R. Stocker y R. T. Dean, *Evidence for Roles of Radicals in Protein Oxidation in Advanced Human Atherosclerotic Plaque*. Biochemical Journal, 1998. **333**: p. 519-525.
99. Z. I. Watts y C. J. Easton, *Peculiar Stability of Amino Acids and Peptides from a Radical Perspective*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(32): p. 11323-11325.
100. M. E. Medina, A. Galano y J. R. Alvarez-Idaboy, *Site reactivity in the free radicals induced damage to leucine residues: a theoretical study*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2015. **17**(7): p. 4970-4976.
101. S. Gebicki y J. M. Gebicki, *Formation of Peroxides in Amino-Acids and Proteins Exposed to Oxygen Free-Radicals*. Biochemical Journal, 1993. **289**: p. 743-749.

102. M. J. Davies, *The oxidative environment and protein damage*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
103. A. S. Domazou, V. Zelenay, W. H. Koppenol y J. M. Gebicki, *Efficient depletion of ascorbate by amino acid and protein radicals under oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(8): p. 1565-1573.
104. D. Voet y J. G. Voet, *Biochemistry*. 4th ed. 2011, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xxv.
105. B. Alberts, *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. xxxiv.
106. A. Wiktorowska-Owczarek, M. Berezinska y J. Z. Nowak, *PUFAs: Structures, Metabolism and Functions*. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 2015. **24**(6): p. 931-941.
107. E. N. Frankel, *Chapter 1 - Free radical oxidation*, in *Lipid Oxidation*. 2012, Woodhead Publishing. p. 15-24.
108. R. E. Pacifici y K. J. A. Davies, *Protein, Lipid and DNA-Repair Systems in Oxidative Stress - the Free-Radical Theory of Aging Revisited*. Gerontology, 1991. **37**(1-3): p. 166-180.
109. K. V. Ramana, S. Srivastava y S. S. Singhal, *Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013.
110. A. E. Bailey y F. Shahidi, *Bailey's industrial oil & fat products / edited by Fereidoon Shahidi*. 6th ed. 2005, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons.
111. J. E. Packer, J. S. Mahood, R. L. Willson y B. S. Wolfenden, *Reactions of the Trichloromethylperoxy Free-Radical (Cl₃coo) with Tryptophan, Tryptophanyl-Tyrosine and Lysozyme*. International Journal of Radiation Biology, 1981. **39**(2): p. 135-141.
112. E. P. L. Hunter, M. F. Desrosiers y M. G. Simic, *The Effect of Oxygen, Antioxidants, and Superoxide Radical on Tyrosine Phenoxyl Radical Dimerization*. Free Radical Biology and Medicine, 1989. **6**(6): p. 581-585.
113. M. Kirsch, M. Lehnig, H. G. Korth, R. Sustmann y H. de Groot, *Inhibition of peroxynitrite-induced nitration of tyrosine by glutathione in the presence of carbon dioxide through both radical repair and peroxynitrate formation*. Chemistry-a European Journal, 2001. **7**(15): p. 3313-3320.
114. J. M. Mayer, D. A. Hrovat, J. L. Thomas y W. T. Borden, *Proton-Coupled Electron Transfer Versus Hydrogen Atom Transfer in Benzyl/Toluene, Methoxyl/Methanol, and Phenoxyl/Phenol Self-Exchange Reactions*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(37): p. 11142-11147.
115. J. M. Mayer, *Proton-Coupled Electron Transfer: A Reaction Chemist's View*. Annual Review of Physical Chemistry, 2004. **55**: p. 363-390.

116. G. A. DiLabio y K. U. Ingold, *A Theoretical Study of the Iminoxyl/Oxime Self-Exchange Reaction. A Five-Center, Cyclic Proton-Coupled Electron Transfer*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(18): p. 6693-6699.
117. G. A. DiLabio y E. R. Johnson, *Lone Pair- π and π - π Interactions Play an Important Role in Proton-Coupled Electron Transfer Reactions*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(19): p. 6199-6203.
118. A. Sirjoosingh y S. Hammes-Schiffer, *Proton-Coupled Electron Transfer versus Hydrogen Atom Transfer: Generation of Charge-Localized Diabatic States*. Journal of Physical Chemistry A, 2011. **115**(11): p. 2367-2377.
119. L. Muñoz-Rugeles, A. Galano y J. Raul Alvarez-Idaboy, *Non-covalent π - π stacking interactions turn off non-adiabatic effects in proton-coupled electron transfer reactions*. Phys Chem Chem Phys, 2017. **19**(10): p. 6969-6972.
120. G. Litwinienko y K. U. Ingold, *Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph[•]) in alcohols*. Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(9): p. 3433-3438.
121. G. Litwinienko y K. U. Ingold, *Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction. 2. Resolution of the Curcumin Antioxidant Controversy. The Role of Sequential Proton Loss Electron Transfer*. Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(18): p. 5888-5896.
122. G. Litwinienko y K. U. Ingold, *Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction. 3. Novel Kinetics in Sequential Proton Loss Electron Transfer Chemistry*. Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**(22): p. 8982-8990.
123. G. Litwinienko y K. U. Ingold, *Solvent Effects on the Rates and Mechanisms of Reaction of Phenols with Free Radicals*. Accounts of Chemical Research, 2007. **40**(3): p. 222-230.
124. A. Galano y J. R. Alvarez-Idaboy, *Kinetics of Radical-Molecule Reactions in Aqueous Solution: A Benchmark Study of the Performance of Density Functional Methods*. Journal of Computational Chemistry, 2014. **35**(28): p. 2019-2026.
125. P. Hohenberg y W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*. Physical Review B, 1964. **136**(3B): p. B864-B871.
126. Y. Zhao, N. E. Schultz y D. G. Truhlar, *Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2006. **2**(2): p. 364-382.

127. A. D. Boese, J. M. L. Martin y N. C. Handy, *The role of the basis set: Assessing density functional theory*. Journal of Chemical Physics, 2003. **119**(6): p. 3005-3014.
128. M. Rami Reddy y M. D. Erion, *Free energy calculations in rational drug design*. 2001, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. xxii, p. 63-95.
129. A. V. Marenich, C. J. Cramer y D. G. Truhlar, *Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(18): p. 6378-6396.
130. R. S. Mulliken, *Electronic Population Analysis on Lcao-Mo Molecular Wave Functions .1*. Journal of Chemical Physics, 1955. **23**(10): p. 1833-1840.
131. A. E. Reed, R. B. Weinstock y F. Weinhold, *Natural-Population Analysis*. Journal of Chemical Physics, 1985. **83**(2): p. 735-746.
132. F. L. Hirshfeld, *Bonded-Atom Fragments for Describing Molecular Charge-Densities*. Theoretica Chimica Acta, 1977. **44**(2): p. 129-138.
133. H. Eyring, *The activated complex in chemical reactions*. Journal of Chemical Physics, 1935. **3**(2): p. 107-115.
134. M. G. Evans y M. Polanyi, *Further considerations on the thermodynamics of chemical equilibria and reaction rates*. Transactions of the Faraday Society, 1936. **32**(2): p. 1333-1359.
135. D. G. Truhlar, W. L. Hase y J. T. Hynes, *Current Status of Transition-State Theory*. Journal of Physical Chemistry, 1983. **87**(15): p. 2664-2682.
136. E. Pollak y P. Pechukas, *Symmetry numbers, not statistical factors, should be used in absolute rate theory and in Broensted relations*. Journal of the American Chemical Society, 1978. **100**(10): p. 2984-2991.
137. H. S. Johnston y J. Heicklen, *Tunnelling Corrections for Unsymmetrical Eckart Potential Energy Barriers*. Journal of Physical Chemistry, 1962. **66**(3): p. 532-533.
138. R. L. Brown, *A Method of Calculating Tunneling Corrections for Eckart Potential Barriers*. Journal of Research of the National Bureau of Standards, 1981. **86**(4): p. 357-359.
139. P. Atkins y J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*. 2010: OUP Oxford.
140. S. W. Benson, *The Foundations of Chemical Kinetics*. McGraw-Hill series in advanced chemistry. 1960: McGraw-Hill.
141. R. A. Marcus, *Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory*. Annual Review of Physical Chemistry, 1964. **15**: p. 155-196.

142. R. A. Marcus y N. Sutin, *Electron Transfers in Chemistry and Biology*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1985. **811**(3): p. 265-322.
143. R. A. Marcus, *Electron transfer reactions in chemistry - Theory and experiment*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1997. **438**(1-2): p. 251-259.
144. G. G. Stokes, *Mathematical and Physical Papers*. Cambridge Library Collection - Mathematics. Vol. 3. 1903, Cambridge: Cambridge University Press.
145. A. Einstein, *The motion of elements suspended in static liquids as claimed in the molecular kinetic theory of heat*. Annalen Der Physik, 1905. **17**(8): p. 549-560.
146. F. C. Collins y G. E. Kimball, *Diffusion-Controlled Reaction Rates*. Journal of Colloid Science, 1949. **4**(4): p. 425-437.
147. A. Galano y J. R. Alvarez-Idaboy, *Guanosine plus OH Radical Reaction in Aqueous Solution: A Reinterpretation of the UV-vis Data Based on Thermodynamic and Kinetic Calculations*. Organic Letters, 2009. **11**(22): p. 5114-5117.
148. E. Velez, J. Quijano, R. Notario, E. Pabon, J. Murillo, J. Leal, E. Zapata y G. Alarcon, *A computational study of stereospecificity in the thermal elimination reaction of menthyl benzoate in the gas phase*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2009. **22**(10): p. 971-977.
149. G. Black y J. M. Simmie, *Barrier Heights for H-Atom Abstraction by HO₂[•] from n-Butanol-A Simple Yet Exacting Test for Model Chemistries?* Journal of Computational Chemistry, 2010. **31**(6): p. 1236-1248.
150. T. Furuncuoglu, I. Ugur, I. Degirmenci y V. Aviyente, *Role of Chain Transfer Agents in Free Radical Polymerization Kinetics*. Macromolecules, 2010. **43**(4): p. 1823-1835.
151. M. v. Smoluchowski, *Grundriß der Koagulationskinetik kolloider Lösungen*. Kolloid-Zeitschrift, 1917. **21**(3): p. 98-104.
152. M. G. Simic y S. V. Jovanovic, *Antioxidation Mechanisms of Uric-Acid*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(15): p. 5778-5782.
153. K. Kahn, P. Serfozo y P. A. Tipton, *Identification of the True Product of the Urate Oxidase Reaction*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(23): p. 5435-5442.
154. N. H. Williams y J. K. Yandell, *Outer-Sphere Electron-Transfer Reactions of Ascorbate Anions*. Australian Journal of Chemistry, 1982. **35**(6): p. 1133-1144.
155. A. Ruchmann, J. Lauterwein, T. Backer y M. Klessinger, *¹⁷O NMR of L-Ascorbic Acid. New Spectroscopy of an Old Molecule*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1996. **34**(2): p. 116-122.

156. A. Meister, *Glutathione Metabolism and Its Selective Modification*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(33): p. 17205-17208.
157. E. Madej y P. Wardman, *The oxidizing power of the glutathione thiyl radical as measured by its electrode potential at physiological pH*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **462**(1): p. 94-102.
158. W. P. Jencks y J. Regenstein, *Ionization Constants of Acids and Bases*, in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition*. 2010, CRC Press. p. 595-635.
159. S.-W. Huang, A. Hopia, K. Schwarz, E. N. Frankel y J. B. German, *Antioxidant Activity of α -Tocopherol and Trolox in Different Lipid Substrates: Bulk Oils vs Oil-in-Water Emulsions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(2): p. 444-452.
160. V. F. Sagach, M. Scrosati, J. Fielding, G. Rossoni, C. Galli y F. Visioli, *The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E*. Pharmacological Research, 2002. **45**(6): p. 435-439.
161. J. B. Arellano, H. Li, S. Gonzalez-Perez, J. Gutierrez, T. B. Melo, F. Vacha y K. R. Naqvi, *Trolox, a Water-Soluble Analogue of alpha-Tocopherol, Photoprotects the Surface-Exposed Regions of the Photosystem II Reaction Center in Vitro. Is This Physiologically Relevant?* Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8291-8301.
162. M. E. Alberto, N. Russo, A. Grand y A. Galano, *A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(13): p. 4642-4650.
163. L. R. C. Barclay y M. R. Vinqvist, *Membrane Peroxidation - Inhibiting Effects of Water-Soluble Antioxidants on Phospholipids of Different Charge Types*. Free Radical Biology and Medicine, 1994. **16**(6): p. 779-788.
164. R. H. Bisby, C. G. Morgan, I. Hamblett y A. A. Gorman, *Quenching of Singlet Oxygen by Trolox C, Ascorbate, and Amino Acids: Effects of pH and Temperature*. Journal of Physical Chemistry A, 1999. **103**(37): p. 7454-7459.
165. S. Steenken y P. Neta, *One-Electron Redox Potentials of Phenols - Hydroxyphenols and Aminophenols and Related-Compounds of Biological Interest*. Journal of Physical Chemistry, 1982. **86**(18): p. 3661-3667.
166. B. H. J. Bielski, *Reevaluation of the Spectral and Kinetic Properties of HO₂ AND O₂⁻ Free Radicals*. Photochemistry and Photobiology, 1978. **28**(4-5): p. 645-649.

167. K. Sehested, J. Holcman, E. Bjergbakke y E. J. Hart, *A Pulse Radiolytic Study of the Reaction $\text{OH} + \text{O}_3$ in Aqueous-Medium*. Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(18): p. 4144-4147.
168. B. G. Kwon y J. H. Lee, *Determination of Hydroperoxyl/Superoxide Anion Radical ($\text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^\bullet$) Concentration in the Decomposition of Ozone Using a Kinetic Method*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2006. **27**(11): p. 1785-1790.
169. R. Santus, L. K. Patterson y M. Bazin, *The Diffusion-Controlled Reaction of Semioxidized Tryptophan with the Superoxide Radical-Anion*. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **19**(6): p. 837-842.
170. R. Santus, L. K. Patterson, G. L. Hug, M. Bazin, J. C. Maziere y P. Morliere, *Interactions of Superoxide Anion with Enzyme Radicals: Kinetics of Reaction with Lysozyme Tryptophan Radicals and Corresponding Effects on Tyrosine Electron Transfer*. Free Radical Research, 2000. **33**(4): p. 383-391.
171. W. A. Prutz, J. Butler y E. J. Land, *Phenol Coupling Initiated by One-Electron Oxidation of Tyrosine Units in Peptides and Histone*. International Journal of Radiation Biology, 1983. **44**(2): p. 183-196.
172. S. H. Yalkowsky, *Handbook of Aqueous Solubility Data*. 2003: CRC Press.
173. Y. V. Yushkova, E. I. Chernyak, S. V. Morozov y I. A. Grigor'ev, *Antioxidants Based on Covalently and Ionically Bound Trolox Conjugates*. Chemistry of Natural Compounds, 2015. **51**(6): p. 1070-1073.
174. A. Nahum y C. Horvath, *Evaluation of Octanol-Water Partition-Coefficients by Using High-Performance Liquid-Chromatography*. Journal of Chromatography, 1980. **192**(2): p. 315-322.
175. F. Yamamoto, E. Kuwano, T. Kaneshiro, S. Sasaki y M. Maeda, *^{125}I -labeled 2-O- and 3-O-m-iodobenzyl, and 6-O-m-iodophenyl derivatives of L-ascorbic acid: synthesis and preliminary tissue distribution*. Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, 2003. **46**(8): p. 737-750.
176. N. C. f. B. I. P. C. Database. CID=124886. [cited 2017 13 Mar.]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886>.
177. S. E. Bariamis, G. E. Magoulas, K. Grafanaki, E. Pontiki, T. Tsegenidis, C. M. Athanassopoulos, G. Maroulis, D. Papaioannou y D. Hadjipavlou-Litina, *Synthesis and biological evaluation of new C-10 substituted dithranol pleiotropic hybrids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015. **23**(22): p. 7251-7263.
178. J. J. Warren, T. A. Tronic y J. M. Mayer, *Thermochemistry of Proton-Coupled Electron Transfer Reagents and its Implications*. Chemical Reviews, 2010. **110**(12): p. 6961-7001.

179. S. Hammes-Schiffer y A. A. Stuchebrukhov, *Theory of Coupled Electron and Proton Transfer Reactions*. Chemical Reviews, 2010. **110**(12): p. 6939-6960.
180. S. V. Jovanovic, A. Harriman y M. G. Simic, *Electron-Transfer Reactions of Tryptophan and Tyrosine Derivatives*. Journal of Physical Chemistry, 1986. **90**(9): p. 1935-1939.
181. A. Galano y J. R. Alvarez-Idaboy, *Atmospheric reactions of oxygenated volatile organic compounds plus OH radicals: Role of hydrogen-bonded intermediates and transition states*, in *Advances in Quantum Chemistry, Vol 55: Applications of Theoretical Methods to Atmospheric Science*. 2008. p. 245-274.
182. W. A. Remers, *Properties and Reactions of Indoles, Isoindoles, and Their Hydrogenated Derivatives*, in *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1971, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-226.
183. A. K. Harshan, T. Yu, A. V. Soudackov y S. Hammes-Schiffer, *Dependence of Vibronic Coupling on Molecular Geometry and Environment: Bridging Hydrogen Atom Transfer and Electron-Proton Transfer*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(42): p. 13545-13555.
184. H. S. Rzepa y C. Wentrup, *Mechanistic Diversity in Thermal Fragmentation Reactions: A Computational Exploration of CO and CO₂ Extrusions from Five-Membered Rings*. Journal of Organic Chemistry, 2013. **78**(15): p. 7565-7574.
185. J. R. Casey, S. Grinstein y J. Orłowski, *Sensors and regulators of intracellular pH*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(1): p. 50-61.
186. X. W. Fang, F. M. Jin, H. F. Jin y C. von Sonntag, *Reaction of the superoxide radical with the N-centered radical derived from N-acetyltryptophan methyl ester*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 1998(2): p. 259-263.
187. R. L. Jensen, J. Arnbjerg y P. R. Ogilby, *Reaction of Singlet Oxygen with Tryptophan in Proteins: A Pronounced Effect of the Local Environment on the Reaction Rate*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(23): p. 9820-9826.
188. H. C. DeFedericis, H. B. Patrzyc, M. J. Rajewski, E. E. Budzinski, H. Iijima, J. B. Dawidzik, M. S. Evans, K. F. Greene y H. C. Box, *Singlet oxygen-induced DNA damage*. Radiation Research, 2006. **165**(4): p. 445-451.
189. S. Steenken y P. Neta, *Transient Phenoxyl Radicals: Formation and Properties in Aqueous Solutions*, in *The Chemistry of Phenols*. 2003, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1107-1152.
190. M. R. Defelippis, C. P. Murthy, M. Faraggi y M. H. Klapper, *Pulse Radiolytic Measurement of Redox Potentials - the Tyrosine and Tryptophan Radicals*. Biochemistry, 1989. **28**(11): p. 4847-4853.

191. S. D. Glover, C. Jorge, L. Liang, K. G. Valentine, L. Hammarstrom y C. Tommos, *Photochemical Tyrosine Oxidation in the Structurally Well-Defined alpha Y-3 Protein: Proton-Coupled Electron Transfer and a Long-Lived Tyrosine Radical*. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. **136**(40): p. 14039-14051.
192. R. P. Bell, *The Theory of Reactions Involving Proton Transfers*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences*, 1936. **154**(882): p. 414.

Apéndice A1

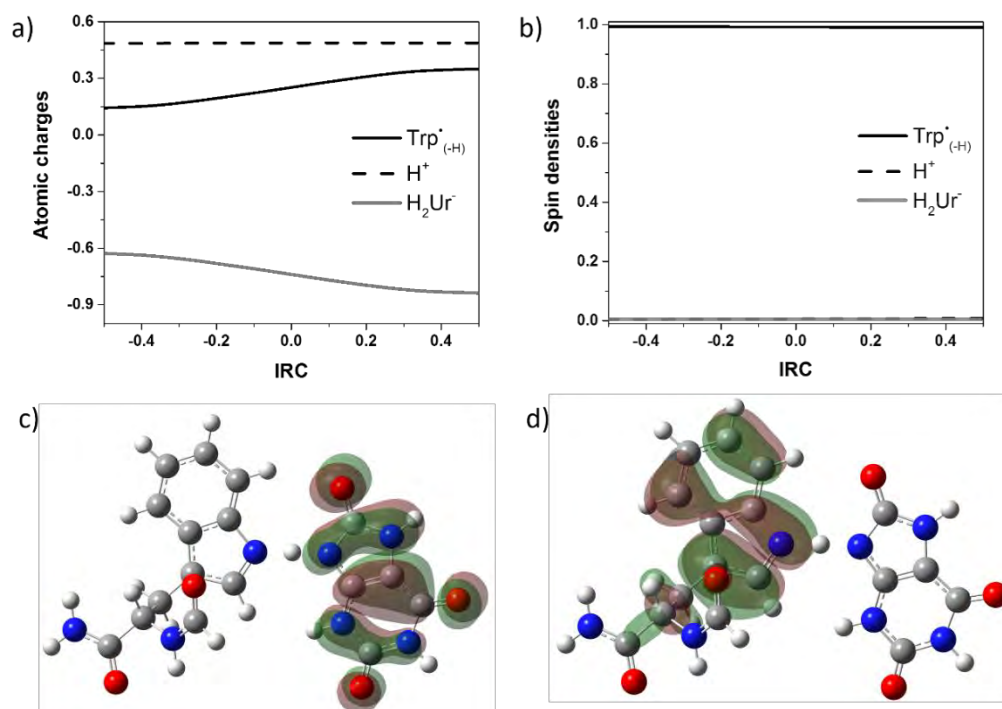


Figura A1-1. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y H_3Ur (NH₂). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

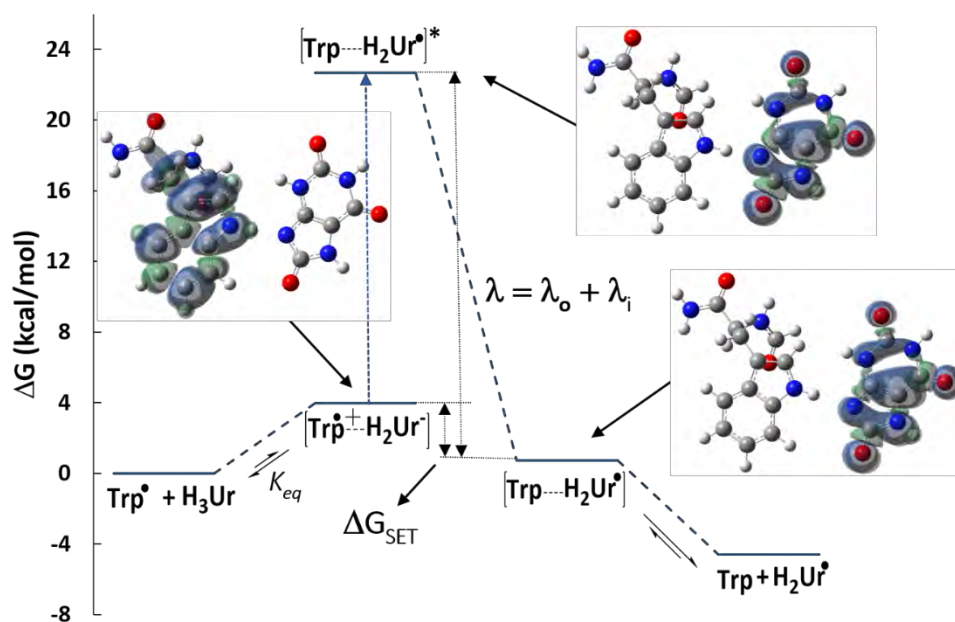


Figura A1-2. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por H_3Ur (NH₂) a través del mecanismo de reacción PEST. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

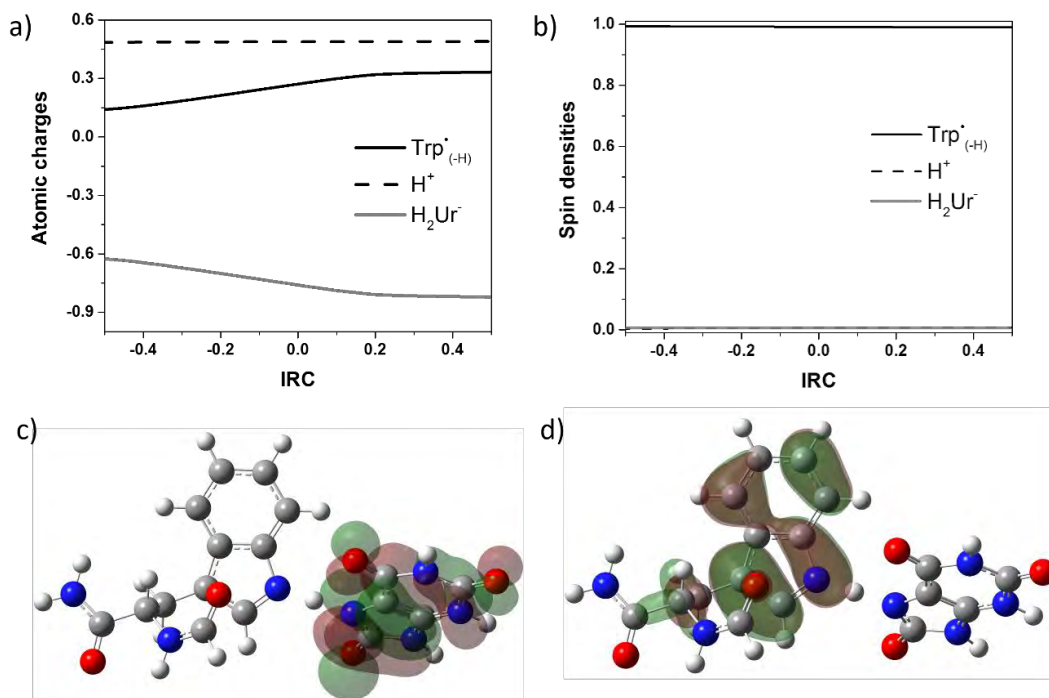


Figura A1-3. Reacción de reparación entre el radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ y H_3Ur (NH_3). Cargas atómicas NPA (a) y densidad de espín Hirshfeld (b) a través de la coordenada de reacción, densidades de los orbitales HOMO (c) y SOMO (d) (valor de isodensidad de 0.02 au) a la geometría del estado de transición.

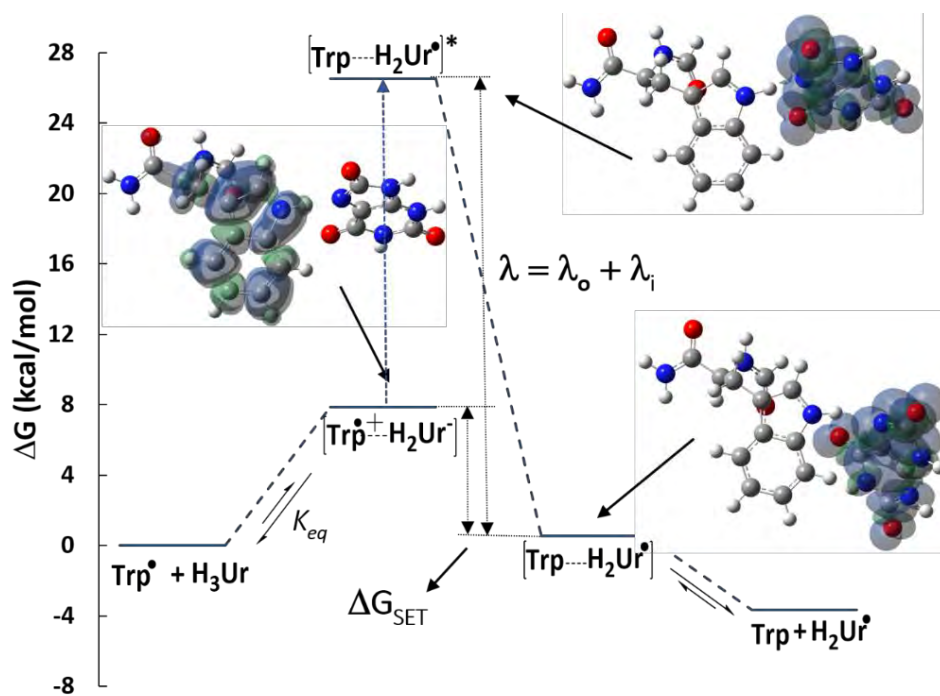


Figura A1-4. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ por H_3Ur (NH_3) a través del mecanismo de reacción PEST. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

Apéndice A2

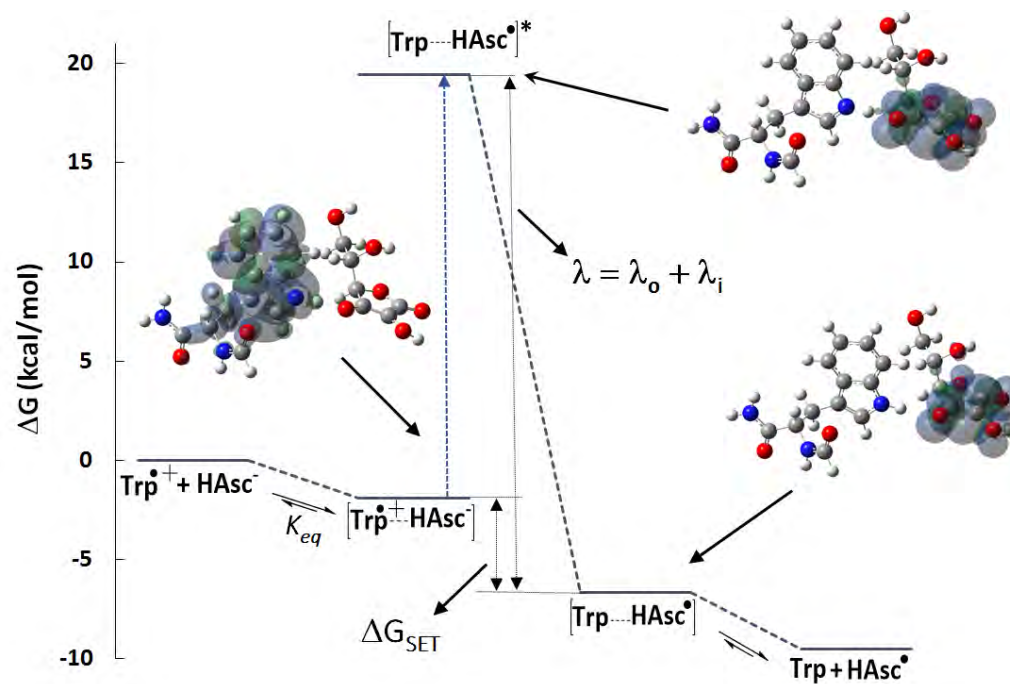


Figura A2-1. Perfil de reacción para la reparación del radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por HAsc^- a través del mecanismo de reacción SPGET. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

Apéndice A3

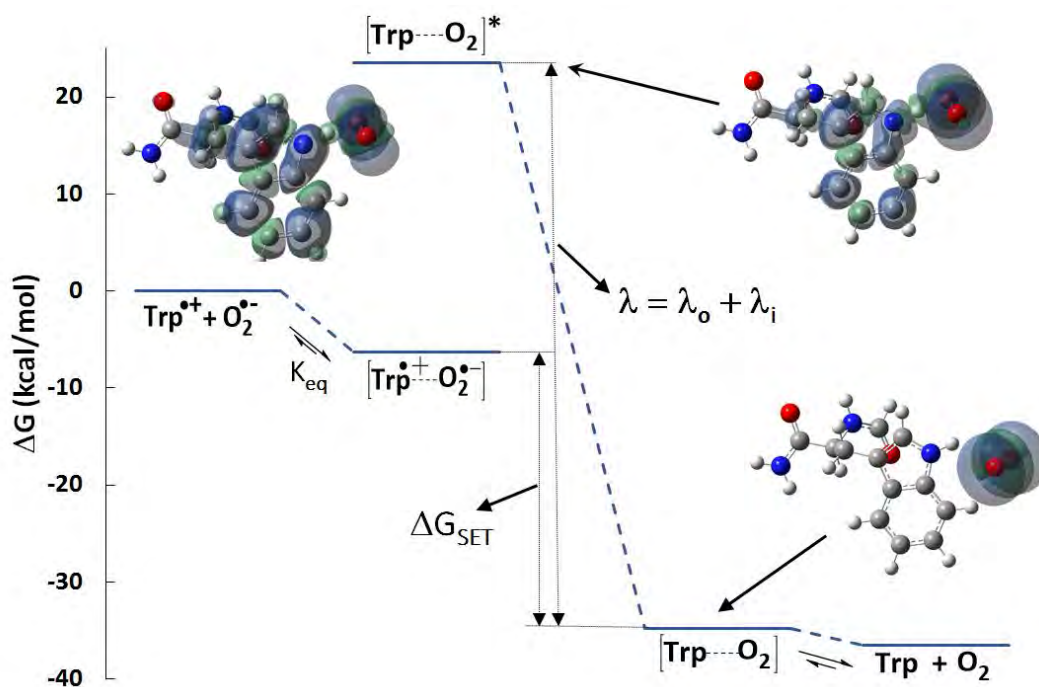


Figura A3-1. Perfil de reacción para la reparación del catión radical $\text{Trp}^{\bullet+}$ por el anión radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ a través del mecanismo de reacción SPGET. Se muestran las densidades de espín para los complejos considerados.

Apéndice A4

Tabla A3-1. Energías libres (ΔG_{rx} , kcal/mol) de reacción para la transferencia electrónicas desde las diferentes fracciones de los reparadores hacia los radicales de Leu centrados en átomos de carbono.

| Reparador | ΔG_{rx} | | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------|------------|------------|
| | C_α | C_β | C_γ | C_δ |
| H ₃ Ur | 52.53 | 72.31 | 84.61 | 75.16 |
| H ₂ Ur ⁻ | 35.93 | 55.71 | 68.01 | 58.56 |
| HUr ²⁻ | 22.50 | 42.28 | 54.59 | 45.13 |
| H ₂ Asc | 59.26 | 79.04 | 91.34 | 81.89 |
| HAsc ⁻ | 31.48 | 51.26 | 63.56 | 54.11 |
| GSH ₂ | 62.45 | 82.23 | 94.53 | 85.08 |
| GSH ⁻ | 63.99 | 83.77 | 96.07 | 86.62 |
| GS ²⁻ | 21.30 | 41.09 | 53.39 | 43.93 |
| H ₂ Tx | 39.78 | 59.57 | 71.87 | 62.41 |
| HTx ⁻ | 34.67 | 54.45 | 66.75 | 57.30 |

PUBLICACIONES



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2017, 19, 15296

The role of acid–base equilibria in formal hydrogen transfer reactions: tryptophan radical repair by uric acid as a paradigmatic case†

Leonardo Muñoz-Rugeles,^a Annia Galano^b and Juan Raúl Alvarez-Idaboy^{b,*a}

The results presented in this work demonstrate the high complexity of chemical reactions involving species with multiple acid–base equilibria. For the case study investigated here, it was necessary to consider two radical species for tryptophan ($\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ and $\text{Trp}^{\bullet+}$) and three fractions for uric acid (H_3Ur , H_2Ur^- and HUr^{2-}) in order to properly reproduce the experimental results. At $\text{pH} = 7.4$, two main reaction mechanisms were identified: proton–electron sequential transfer (PEST) and sequential proton gain–electron transfer (SPGET). Combined, they account for more than 99% of the overall reaction, despite the fact that they involve minor species, *i.e.*, H_3Ur and $\text{Trp}^{\bullet+}$, respectively. The excellent agreement between the calculated overall rate constant and the experimental value seems to support this proposal. In addition, if only the dominant species at $\text{pH} = 7.4$ (H_2Ur^- and $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$) were considered, there would be a large discrepancy with the experimental value (about 4 orders of magnitude), which also supports the finding that the key species in this case are not the most abundant ones. The influence of the pH on the kinetics of the investigated reaction was explored. It was found that the maximum repairing ability of uric acid does not occur at physiological pH , but at a more acidic pH ($\text{pH} = 5.0$).

Received 10th March 2017,
Accepted 15th May 2017

DOI: 10.1039/c7cp01557g

rsc.li/pccp

Introduction

Tryptophan (Trp) is an amino acid that is highly susceptible to oxidation by UV radiation, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS).^{1–10} Both free Trp and Trp protein residues are known to react at diffusion-limited rates with hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) and carbonate radical anions ($\text{CO}_3^{\bullet-}$).^{4,11–13} Trp also

reacts very quickly with singlet oxygen and nitric dioxide radicals (NO_2^{\bullet}).^{14,15} Other oxidants, such as metal ions,^{16–18} can also harm Trp residues. For example, low density lipoprotein oxidation by Cu^{2+} is characterized by Trp damage. All these data indicate that the damage to tryptophanyl residues can be a major problem for protein function in the human body and consequently, for human health. This is why repairing damaged Trp residues is crucial for maintaining a good health status.

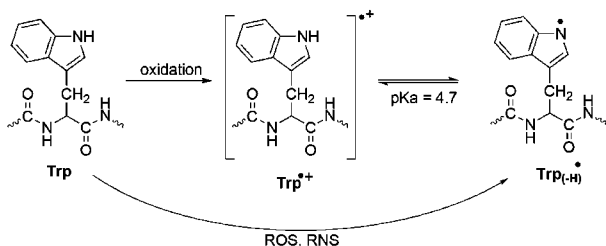
There is experimental evidence that uric acid can be efficient for such repair processes. In fact, it has been proposed that uric acid is responsible for a large part of the antioxidant capacity in the human body.^{19,20} At the same time, elevated serum levels of uric acid have been associated with coronary atherosclerosis,^{21–24} however, it is not clear if the increased concentrations of uric acid are a cause or a consequence of the disease. Although considering uric acid as a triggering factor cannot be ruled out, it can be hypothesized that such an increment in concentration is an attempt by the body to repair oxidized molecules. In fact, hyperuricemia has been correlated with a low risk of stroke, which is related to atherosclerosis, and with a low risk of developing Parkinson's disease, which is related to Tyr oxidation on α -synuclein protein.^{25–31} In addition, there are other pathologies that are associated with low concentrations of uric acid. Some examples are multiple system atrophy, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease.^{32–40} Therefore, further investigations on the role of uric acid in oxidative stress related processes are necessary.

^a Facultad de Química, Departamento de Física y Química Teórica,
Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, Mexico.
E-mail: jidaboy@unam.mx

^b Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,

San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. Iztapalapa, C. P. 09340, México, DF, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available: Deprotonation free energies for H_3Ur and H_2Ur^- fractions (Table S1). Information on the reaction involved in the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by H_3Ur (site 2 and 3) (Table S2). Proton transfer free energies between uric acid fractions and tryptophanyl radical (Table S3) Activation free energies (ΔG^\ddagger , kcal mol⁻¹) between uric acid fractions and tryptophanyl radicals (Fig. S1 and S2). Pre-equilibrium reaction and parameters used to kinetic analysis of PEST mechanism between $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ and H_2Ur^- (Fig. S3). RMS gradient norm along the reaction pathway for repair reaction of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by HUr^{2-} (site 3) (Fig. S4). Distance between the H donor (N3 in HUr^{2-}) and the H acceptor (N atom of tryptophan) along the reaction pathway for repair reaction of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by HUr^{2-} (site 3) (Fig. S5). Information on the reaction involved in the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by HUr^{2-} (site 4) (Fig. S6). Pre-equilibrium reaction and parameters used to kinetic analysis of PEST mechanism between $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ and H_3Ur (site 1, 2 and 3) (Fig. S7–S9). Reactant and product structures. Transition states and complexes structures. The k_{overall} and (k_{exp} or k_{hyp}) for different pHs (Table S4) are included. See DOI: 10.1039/c7cp01557g



Scheme 1 Oxidation paths of tryptophan.

The one electron oxidation of Trp yields the tryptophanyl radical cation ($\text{Trp}^{\bullet+}$), which has a $\text{p}K_{\text{a}} = 4.7$.^{41–43} Thus, at physiological pH (7.4), $\text{Trp}^{\bullet+}$ is easily deprotonated to produce the neutral tryptophanyl radical ($\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$) (Scheme 1). This radical can also be formed through hydrogen atom abstraction by reactive species.⁴⁴ On the other hand, uric acid (H_nUr^q) has two $\text{p}K_{\text{a}}$ values (5.80 and 10.85);^{45,46} thus, it can exist in three different acid–base forms: neutral (H_3Ur), monoanionic (H_2Ur^-) and dianionic (HUr^{2-}), with H_2Ur^- being the most abundant species, at physiological pH. However, since the key species for activity is not always the most abundant one,^{47,48} all the above mentioned species should be considered when analysing the repair of oxidized tryptophan by uric acid. To date, there are no reports taking into account the complexity of acid–base equilibria (three fractions of uric acid and two fractions of Trp radicals) when analysing the chemical repair of damaged tryptophan by uric acid. However, such a detailed investigation would be essential for identifying the mechanism, or mechanisms, involved in the repair process.

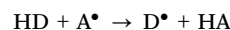
Some important information has thus far been gathered on the subject. There is evidence that uric acid, particularly when it occurs as H_2Ur^- , can efficiently repair $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ sites in different proteins.^{19,20} The measured rate constants vary to some extent, depending on the particular protein involved, and are moderately higher than for the free amino acid. Thus, it has been concluded that the protein environment does not represent an obstacle to the repairing reaction by urate. For *N*-acetyltryptophan amide, the rate constant was reported to be $1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and the proposed reaction mechanism was a formal hydrogen transfer (FHT) from urate to $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$.²⁰ On the other hand it was proposed that H_3Ur is also capable of repairing $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$, but the mechanism in this case was characterized as a proton–electron sequential transfer (PEST) process,⁴⁹ which is a particular case of FHT. According to the results reported in that work, H_3Ur should be considered in the kinetic analysis of experimental results, though it is not the dominant species at physiological pH. However, when chemical reactions involve the transfer of protons and electrons a wide variety of mechanisms may arise, although they all can be globally considered as FHT. Some of them are as follows: hydrogen atom transfer (HAT), proton-coupled electron transfer (PCET), sequential proton-loss electron-transfer (SPLET), proton–electron sequential transfer (PEST), and electron–proton sequential transfer (EPST). Differentiating among all these routes is usually a challenging task, for which computational-based

strategies have been proven to be particularly valuable. The problem becomes even more complicated when there are acid–base equilibria involved and consequently, the relative importance of the different mechanisms can be influenced by the pH, which is the case for the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ repair by uric acid. Accordingly, in the present work, a detailed study of this process has been carried out, using the density functional theory (DFT) to elucidate the relative importance of the possible mechanisms. In the process, a new reaction mechanism was found, namely the sequential proton-gain-electron transfer (SPGET) mechanism.

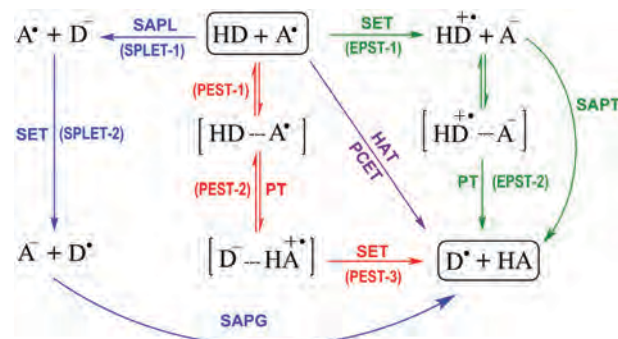
Key features of the reaction mechanisms

Due to the complexity and variety of the reaction mechanisms that might be involved in the process of repairing oxidized tryptophan by uric acid, they are described in detail in this section, emphasizing the features that allow us to differentiate among them. The different routes that can be labeled as FHT mechanisms (Scheme 2) arise from the fact that a hydrogen atom (H^{\bullet}) can be considered as the combination of two particles, one electron (e^-) and one proton (H^+).^{50–52} They can be transferred from one molecule to another in one or more elementary steps. In addition, the proton can be directly transferred between the reacting molecules, or can be involved in a solvent-assisted proton transfer (SAPT). Depending on their acid–base properties, the different species can also be involved in solvent assisted proton loss (SAPL) or solvent assisted proton gain (SAPG) processes.

There are two possibilities for one step reactions: HAT and PCET,^{51,52} and both can be schematically represented as follows:



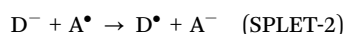
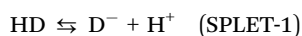
where HD and A^{\bullet} represent the hydrogen donor and the hydrogen acceptor, respectively (in this work: HD = uric acid and $\text{A}^{\bullet} = \text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$). In HAT reactions the proton and the electron are transferred together as a single entity, *i.e.*, a hydrogen atom. In PCET the electron and proton are concertedly transferred in



Scheme 2 Different reaction mechanisms that can be globally classified as FHT. HD = hydrogen donor, A^{\bullet} = hydrogen acceptor, SET = single electron transfer, PT = proton transfer, SAPT = solvent-assisted proton transfer, SAPL = solvent-assisted proton loss, SAPG = solvent-assisted proton gain.

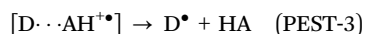
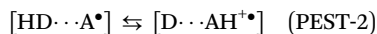
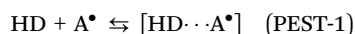
a single step without any stable intermediate, but as two separated particles. The main difference between these mechanisms is that in HAT the donor and the acceptor are the same for the electron and the proton, while in PCET they are different; that is why a commonly accepted way of describing PCET is as a reaction involving a proton and an electron transferred from different sets of orbitals. In HAT the contributions to the electron density of the HOMO and SOMO orbitals come essentially from the atomic orbitals involved in the H[•] transfer and there is no important redistribution of charge throughout the process;^{50,52} in contrast, PCET reactions are associated with significant molecular charge redistribution.^{50–52} PCET and HAT mechanisms can also be classified as electronically non-adiabatic and adiabatic reactions, respectively.^{50,53,54}

Reaction mechanisms that comprise more than one elementary step include SPLET, PEST, and EPST (Scheme 2). The SPLET mechanism can be schematically represented as follows:



The first step consists of a deprotonation to the environment, here referred to as SAPL, which is ruled by the pK_a of the hydrogen donor (HD) and the pH of the solution. The second step is a single electron transfer (SET) reaction from the deprotonated species (D[−]) towards the radical (A[•]). This second step can be followed by another SAPG process that restores the anion (A[−]) to its neutral form; however, the extent of this last step would be determined by the proton affinity of the anion. In addition, since the SAPL and SAPG steps would be mainly ruled by the relationship between the pH of the environment and the pK_a of the involved species, the SET step is the one controlling the kinetics of the overall process. The SPLET mechanism has been associated with the DPPH scavenging activity of phenolic compounds, and has allowed the explanation of the experimental observations related to it.^{55–58}

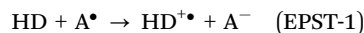
In a PEST mechanism, the first step involves the formation of a reactant complex between A[•] and DH, then an intramolecular proton transfer (PT) yields a new complex that involves AH^{•+} and D[−], which in turn yields the separated products after a SET reaction:⁴⁹



Therefore, PEST is particularly relevant when DH is a better proton donor than the solvent.⁴⁹ In the particular case studied in this work, the completely protonated species of uric acid (H₃Ur) has been proposed to significantly contribute to the overall repair processes of Trp_(-H)[•] through a PEST process.⁴⁹ There are two key aspects regarding this mechanism. The first one is that for PEST to be important, the pK_a of HD and AH^{•+} should be similar and HD should be more acidic than the solvent. The second one is that in the [D[−]⋯AH^{•+}] complex, the SET

reaction occurs significantly faster than in [HD⋯A[•]]. Thus, the net result corresponds to a FHT process.

The EPST mechanism can be represented as two consecutive steps:



The first step has only one possible chemical route and corresponds to an SET reaction from HD to A[•], and the second step can be defined as a PT from HD^{•+} to A[−].⁵⁹ However, contrary to what was described for the PEST mechanism, the EPST process does not necessarily involve the formation of a complex; thus the PT can be a solvent assisted process, or it can take place intramolecularly if the complex is formed (Scheme 2). Moreover, PT through a complex would prevail over SAPT only if HD^{•+} is a better proton donor than the solvent. In any case, it seems logical to assume that SET (EPST – step 1) is the rate-determining step in the EPST mechanism, *i.e.* PT after SET is expected to occur at diffusion-controlled rates.

In addition, it should be noted that although the term single electron transfer (SET) is frequently found in literature, it does not always correspond the same chemical route. In particular, for chemical species involved in acid–base equilibria, it can become ambiguous. This is because it can implicitly refer to a SET from the completely protonated species or from the most abundant acid–base species at a particular pH. In this work the term SET has been used to label elementary electron transfer steps within more complex mechanisms.

Computational details

All of the electronic calculations were performed with the Gaussian 09 package of programs.⁶⁰ Geometry optimizations and frequency calculations were carried out using the M05-2X functional⁶¹ and 6-31+G(d,p) basis set, in conjunction with the continuum solvation model based on density (SMD).⁶² Water was used as solvent because acid–base equilibria are expected to be particularly important in aqueous solution. Local minima and transition states were identified by frequency analysis (number of imaginary frequencies NIMAG = 0 or 1, respectively). Intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations were used to confirm that the located transition states properly connected the intended reactants and products. Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies.

Thermodynamic calculations

The thermodynamic viability of the different processes that might contribute to the repair of oxidized tryptophan by uric acid was analyzed in terms of Gibbs free energies of reaction (ΔG), at 298.15 K. The reactions found to be endergonic were ruled out based on the assumption that even if they take place at a significant rate, they would be reversible and therefore, the formed products would not be observed. Accordingly, they are not included in the kinetic calculations. However,

such reactions might still be significant if their products rapidly react further. This would be particularly important if the later stages are sufficiently exergonic to provide a driving force, and if their reaction barriers are low; due to the complexity of the biological systems in which there are a wide variety of chemicals present, it is likely that this could be the case under such conditions. This would certainly be valid for reactions yielding radical-ionic species, which are prompted to be involved in fast protonation, or deprotonation, processes. In addition, slightly endergonic processes can be important when there are no exergonic competing paths. Therefore, some reactions with positive, but low, values of ΔG have been included in the kinetic analyses.

Mechanistic analysis

Identifying the reaction mechanism involved in a chemical reaction is crucial to rationalizing the reactivity of chemical compounds. The inspection of spin densities and charges through the reaction pathway was used to identify whether a FHT mechanism is sequential or concerted, unambiguously distinguishing between PEST, EPST, HAT and PCET mechanisms.^{49,50} The evolution of spin densities and atomic charges along the IRC have allowed the classification of the hydrogen exchange reaction between phenol and phenoxy radicals as a PCET reaction, and the hydrogen exchange between toluene and benzyl radical as a HAT reaction.⁵⁰ Additionally, the HOMO and SOMO orbitals at transition state geometry (TS) can reveal preliminary information about the reaction mechanism.^{49,52,63} When the HOMO is located on the donor or acceptor, the transition state (TS) corresponds to a proton transfer (PT) step and the mechanism can be PEST or EPST, respectively.⁴⁹ If the HOMO and SOMO orbitals are delocalized over the donor and the acceptor, the mechanism can be HAT or PCET and their differentiation will be evident only by spin density and charge analyses.^{50,52,63} Therefore, the evolution of atomic charges and spin densities were used in this work to classify the reactions studied as a particular FHT mechanism. The data for such analyses, as a function of the reaction coordinate, were obtained using the points on the ground state reaction path (generated from IRC calculations), the natural population analysis (NPA) for the determination of atomic charges and the Hirshfeld partition scheme for analysing spin densities.^{50,64–66} The orbitals of the optimized transition state structures, necessary for the HOMO and SOMO analyses, were obtained using restricted open shell M05-2X with 6-31+G(d,p) basis set and the SMD continuum model.

Kinetic calculations

The kinetic calculations performed in this work are in line with the quantum mechanics-based test for overall free radical scavenging activity (QM-ORSA).⁶⁷ This protocol allows identification of the key species and mechanisms involved in molecule-free radical reactions, explicitly considering the different fractions arising from acid–base equilibrium. This protocol has been successfully used to explain the free radical scavenging activity of several antioxidants such as glutathione, sesamol, caffeine,

melatonin, capsaicin and ascorbic acid towards diverse oxidants including hydroxyl (HO^\bullet), methoxy ($\text{CH}_3\text{O}^\bullet$), trichloromethoxy ($\text{CCl}_3\text{O}^\bullet$), and peroxy (ROO^\bullet) radicals, to cite a few examples.^{47,48,67–71}

The QM-ORSA protocol was previously validated by comparison with experimental results for 16 reactions. Its uncertainties were found to be very small, with the maximum deviation being a calculated rate constant 2.9 times lower than the experimental value (this corresponds to a reaction barrier overestimated by only 0.64 kcal mol⁻¹).⁶⁷ In addition, there is also a previous benchmark study on the performance of the QM-ORSA when used in combination with 18 density functional theory (DFT) approximations and 19 reactions between radicals and closed-shell molecules. It showed that the mean unsigned error arising from calculations using the M05-2X functional and the SMD solvation model (used in this work) is about 1.2 kcal mol⁻¹ for the reaction barriers.⁷² Moreover, due to large amounts of calculations involved in that investigation, the kinetic data were estimated using the assumed mechanisms. Thus, it is quite possible that part of such error (1.2 kcal mol⁻¹) arises from missing competing mechanisms.

Some relevant details on the used computational protocol are described next. The rate constants were calculated using the conventional transition state theory (TST) and 1 M standard state, according to the following equation:

$$k^{\text{TST}} = \sigma \kappa(T) \frac{k_{\text{B}} T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT} \quad (1)$$

where ΔG^\ddagger represents the Gibbs activation energy, σ is reaction path degeneracy, $\kappa(T)$ is the tunneling correction, T is the temperature, k_{B} , h and R are the Boltzmann, Planck and ideal gas constants, respectively. For studied reactions, $\sigma = 1$ because there is no rotational symmetry at TS geometries.^{67,73–75} The correction factor $\kappa(T)$ for FHT reactions has been calculated using the zero-curvature tunneling method.⁷⁶

For single electron transfer (SET) reactions, ΔG^\ddagger values were calculated using the Marcus theory:

$$\Delta G^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{\text{SET}}}{\lambda} \right)^2 \quad (2)$$

where ΔG_{SET} is the free energy of reaction and λ is the reorganization energy.^{77,78} Results obtained from eqn (2) are directly replaced in eqn (1) (with $\sigma = 1$ and $\kappa(T) = 1$). In this work, when SET takes place within a reactant complex, the reaction is consistent with a vertical electron transfer, followed by the complex relaxation and the dissociation of the complex, yielding the separated products. In such cases, the ΔG_{SET} values were calculated between reactant and product complexes. In addition, λ values were calculated as the sum of two reorganization energies, the internal (λ_{i}) and solvent (λ_{o}) reorganization energies, *i.e.* $\lambda = \lambda_{\text{i}} + \lambda_{\text{o}}$,^{79,80} with the λ_{i} values calculated as follows:

$$\lambda_{\text{i}} = \Delta E_{\text{SET}} - \Delta G_{\text{SET}} \quad (3)$$

where ΔE_{SET} is the non-adiabatic energy difference between the reactant complex and vertical product complex, which is

obtained by a simple point calculation at the reactant complex geometry. The λ_o values were obtained on the basis of the simple 2-sphere model according to Marcus:

$$\lambda_o = \Delta q^2 \left(\frac{1}{\epsilon_\infty} - \frac{1}{\epsilon_o} \right) \left(\frac{1}{2r_A} + \frac{1}{2r_D} - \frac{1}{r_{AD}} \right) \quad (4)$$

where Δq is the amount of charge transferred, r_A , r_D and r_{AD} are the effective radii of the acceptor (A), donor (D) and reactant complex (AD), and ϵ_o and ϵ_∞ are the static and optical dielectric constants of the solvent, respectively.^{79,80}

Calculated rate constants with k^{TST} values close to the diffusion limit were further corrected using the Collins–Kimball theory:

$$k = \frac{k_D k^{\text{TST}}}{k_D + k^{\text{TST}}} \quad (5)$$

where k^{TST} is the thermal rate constant obtained from TST calculations, and k_D is the steady-state Smoluchowski rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:⁸¹

$$k_D = 4\pi R D_{AD} N_A \quad (6)$$

where R denotes the reaction distance, N_A is the Avogadro number, and D_{AD} is the mutual diffusion coefficient of the reactants A and D. D_{AD} has been calculated from D_A and D_D according to literature,⁸² and D_A and D_D have been estimated from the Stokes–Einstein approach:^{83,84}

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (7)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, η denotes the viscosity of the solvent and a is the radius of the solute.

In addition, for reactions involving acid–base species, the calculated rate constants can be corrected, considering their abundance at the pH of interest. To do so, the corresponding molar fractions are considered in the calculations:

$$k_{A^*+DH}^{\text{pH}} = \text{mf}(A^*) \times \text{mf}(DH) \times k_{A^*+DH}^{\text{TST}} \quad (8)$$

where A^* and DH represent the H (or electron) acceptor and donor, respectively; and $\text{mf}(A^*)$ and $\text{mf}(DH)$ are their molar fractions at the pH of interest.

The molar fractions are calculated from the pK_a values of the reactants as follows:

$$\text{mf}(X^{n-}) = \frac{1}{1 + \sum_{j=1}^i \beta_j [\text{H}^+]^j} \quad (9)$$

where

$$\beta_j = 10^{\sum_{l=1}^j \text{pK}_{a(n+1-l)}} \quad (10)$$

In eqn (9) (H_nX) and (X^{n-}) represent a polyprotic acid and its different deprotonated species, respectively. The pK_a values used here are those experimentally measured, *i.e.*, 4.7 for the tryptophanyl radical cation,^{41–43} and 5.8 and 10.85 for the first and second deprotonations of the uric acid.^{45,46}

Results and discussion

Acid–base equilibria

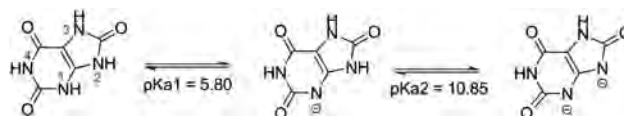
The molar fraction (mf) of all the acid–base species of tryptophan radical and uric acid, in aqueous solution at pH = 7.4, were estimated using the reported pK_a values.^{41–43,45,46} They are $\text{mf}(\text{Trp}^{\bullet+}) = 0.002$, $\text{mf}(\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}) = 0.998$, $\text{mf}(\text{H}_3\text{Ur}) = 0.0245$, $\text{mf}(\text{H}_2\text{Ur}^-) = 0.9752$, and $\text{mf}(\text{HUr}^{2-}) = 3 \times 10^{-4}$. They are used in the kinetic calculations to account for the relative abundance of the different species at the pH of interest. However, while for tryptophan the deprotonated species is unambiguous, for uric acid, there are four possible acidic sites (Scheme 3). Thus, it was necessary to elucidate the deprotonation route. For this purpose, the deprotonation paths requiring less energy were chosen as the most likely ones. They were theoretically investigated and the obtained results (Table S1, ESI†) are in line with experimental evidence from NMR studies.⁸⁵ It was found that the first and second deprotonations involved NH groups labeled as 1 and 2, respectively. This allowed us to unambiguously identify the H_2Ur^- and HUr^{2-} species (Scheme 3), which are the ones used in the rest of the investigation.

Thermochemistry

Two different aspects relevant to the present study were included in the thermochemical analyses:

(i) The thermochemical viability of FHT as a whole process, regardless of the particular mechanism involved (Table 1). It was considered this way since Gibbs free energies are state functions, thus the ΔG between initial reactants and final products is a relevant value for analysing the feasibility of the overall reaction. These analyses were performed for the different acid–base species of uric acid, and for their different sites that can act as H donors.

(ii) The thermochemical viability of the SET steps, *i.e.* elementary SET reactions between the different acid–base species of both uric acid and tryptophan (Table 2). This analysis was performed to identify which particular species are likely to be involved in elementary SET steps. This particular aspect may rule out the feasibility of complex mechanisms involving SET as one of their elementary reaction steps.



Scheme 3 Deprotonation route of uric acid, and site numbering (grey).

Table 1 Gibbs free energies of reaction for the overall FHT processes (kcal mol^{-1}) at 298.15 K

| | H_3Ur | H_2Ur^- | HUr^{2-} |
|--------|-----------------------|-------------------------|-------------------|
| Site 1 | −5.39 | na | na |
| Site 2 | −5.11 | −6.30 | na |
| Site 3 | −4.44 | −11.25 | −12.62 |
| Site 4 | 6.78 | 1.53 | −5.28 |

na = not available.

Table 2 Gibbs free energies of reaction for SET elementary steps (kcal mol⁻¹) at 298.15 K

| | Trp ^{•+} | Trp _(-H) [•] |
|--------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| H ₃ Ur | 10.62 | 33.81 |
| H ₂ Ur ⁻ | -5.98 | 17.22 |
| HUr ²⁻ | -19.40 | 3.79 |

It was found that for the FHT process, there are three different viable reaction pathways when the reacting species is H₃Ur, which involve sites 1, 2 and 3 (Table 1). On the other hand, two viable reaction pathways were identified for H₂Ur⁻ (sites 2 and 3) and HUr²⁻ (3 and 4). In general, the exergonicity of the FHT processes increases with the degree of deprotonation of uric acid, although the number of available reaction sites decreases. The most exergonic reaction pathways are the ones involving site 1 for H₃Ur, and site 3 for H₂Ur⁻ and HUr²⁻. In addition, while for H₃Ur the ΔG values of all the thermochemically viable reaction pathways are rather similar (differences are lower than 1.0 kcal mol⁻¹, Table 1), for H₂Ur⁻ and HUr²⁻ the differences in ΔG are much larger (~5.0 and 7.3 kcal mol⁻¹, respectively, Table 1). This suggests that more than one reaction site may be involved in the FHT process when H₃Ur is acting as the repairing molecule, while one reaction site is expected to be significantly more important than the other for H₂Ur⁻ and HUr²⁻.

Regarding the elementary SET steps (Table 2), those involving Trp_(-H)[•] were systematically found to be endergonic, regardless of the species of uric acid acting as the electron donor (H₃Ur, H₂Ur⁻, or HUr²⁻). This finding rules out, in principle, the possibility of a direct chemical repair of Trp_(-H)[•] sites by elementary SET. However, the ΔG value for the reaction between Trp_(-H)[•] and HUr²⁻ is positive but low, which opens the possibility that this particular reaction might contribute to the overall repair process, provided that it occurs fast enough. On the other hand, although the largest exergonicity was found for the Trp^{•+} + HUr²⁻ reaction, alone, it is not expected to be important under physiological conditions, because of the very low fractions of both species at pH = 7.4. Therefore, simultaneously considering the gathered thermochemical data and the relative abundance of the species, it can be predicted that the Trp^{•+} + H₂Ur⁻ reaction is the most likely elementary SET step, under physiological conditions.

Identification of the most likely reaction mechanisms, depending on the degree of protonation of uric acid

The focus of a mechanistic analysis of the FHT reaction is to determine whether the H⁺ and e⁻ are transferred in a concerted fashion or sequentially; this is in one or more elementary steps (Scheme 2). Molecular properties like acid–base equilibria and redox potentials of the reactant/product pairs allow us to anticipate whether a FHT reaction is sequential.⁸⁶ When the pK_a of both reactants are similar, the H⁺ could be transferred between them, which modifies the redox potential of the starting reagents and increases the probability that a SET step occurs after PT (PEST). In contrast, if redox potentials permit an

e⁻ transfer between reactants, SET becomes the first reaction step. In such cases the e⁻ acceptor increases its basicity and the e⁻ donor its acidity, which favors the H⁺ transfer step (EPST). Similar arguments can be used to anticipate if SPLET could be an active reaction pathway. In this case, the key feature is the pK_a of the antioxidant, *i.e.*, it would determine whether the deprotonation is viable at the pH of interest. If so, the major fraction would correspond to the deprotonated species, usually a good electron donor, which promotes SET as the second elementary step.

For HAT and PCET mechanisms, homolytic bond dissociation free energies (BDFE) of the D–H bond can be used to predict whether a reaction is viable. This is because BDFE values are directly connected with the free energy of reaction, which is the driving force of chemical processes. However, it should be noted that BDFE values do not provide the necessary information to differentiate between HAT and PCET mechanisms, since the initial and final states considered for BDFE do not reflect the nature of the transfer entities, *i.e.*, H atom or H⁺ and e⁻; these energies are useful only for establishing the relative stabilities of products from different formal H donor sites, or to compare formal H donor capacities between different molecules.

To unambiguously identify a particular FHT reaction mechanism, a manifold analysis is required. First, it is necessary to obtain the transition states and the intrinsic reaction coordinates (IRC) connecting reactants with products. Second, an analysis on the evolution of atomic charges and spin densities (on the donor, transferred nucleus and acceptor) as a function of the reaction coordinate should be performed. Third, results from analyses based on transition state structures and IRC could be used to propose the correct rate equations and to calculate the corresponding rate constants. Finally, it would be possible to establish the relative importance of the different reaction pathways at a given pH, and directly compare the calculated values with the experimental kinetic data. Using this strategy, different FHT mechanisms have been identified for the Trp_(-H)[•] repair by uric acid, depending on the involved H_nUr^q species, namely H₃Ur, H₂Ur⁻ and HUr²⁻.

Considering that the pK_a of Trp_(-H)[•] (4.7)⁴¹ and the first pK_a of H₃Ur (5.80)⁴⁶ are close, a reversible H⁺ transfer between them can be expected. The calculated equilibrium constants (K_{PT}) for the formation of PT complexes between these species (Trp_(-H)[•] + H₃Ur \rightleftharpoons [Trp^{•+}...H₂Ur⁻]) are 1.35×10^{-1} , 2.52×10^{-3} and 8.52×10^{-6} M⁻¹, for sites 1, 2 and 3 in H₃Ur, respectively (Table 5 and Table S2, ESI[†]). The trend for K_{PT} values is a consequence of the different acidity of each reactive H site in H₃Ur, which is in line with the deprotonation route predicted in this work and previously proposed from ¹³C-NMR,⁸⁵ *i.e.*, the first deprotonation takes place from site 1. It should be noted that even the most likely route for the formation of [Trp^{•+}...H₂Ur⁻], *i.e.*, involving site 1, is not thermochemically favored. However, it might become relevant, provided that a second (SET) step involving this complex is exergonic and fast enough, *i.e.*, the SET step following PT turns the overall reaction into an irreversible process. This a reasonable assumption,

considering that the electron affinity of chemical systems increases with the protonation degree. In fact, Jovanovic *et al.*⁸⁷ reported that redox potentials (E_0' vs. NHE) of $\text{Trp}^{\bullet+}$ (98% at pH = 3) and $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ (100% at pH = 13) are 0.94 and 0.56 V, respectively, while at pH = 7 it is 0.64 V. On the other hand, Simic *et al.*⁴⁵ reported that the values of E_0' vs. NHE of H_nUr^q are 0.59 V at pH = 7 (H_2Ur^- fraction is 94.1%), 0.47 V at pH = 8.9 (H_2Ur^- fraction is 98.8%) and 0.26 V at pH = 13 (HUr^{2-} fraction is 99.3%).

Tryptophan repair by the completely protonated fraction of uric acid (H_3Ur)

The acid–base and redox properties of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ and H_3Ur , previously discussed, indicate that they may react through a PEST mechanism. The theoretical methodology discussed above has been used to confirm this hypothesis. The NPA atomic charges and Hirshfeld spin densities along the reaction coordinates, and the HOMO and SOMO of the transition state for the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by H_3Ur (site 1) are shown in Fig. 1. NPA charge and Hirshfeld spin density for the transferred nucleus are $\sim 0.5 e$ and 0.004–0.007, respectively, which correspond to a proton transfer.^{49,50} Thus, these values indicate that the potential energy surface in this case corresponds to a PT process and consequently, there is no donor–acceptor spin density switching as the reaction proceeds. Additionally, at the TS geometry, the HOMO and SOMO natural orbitals are located over both the H donor and acceptor, respectively, features that are related to a PT step.⁴⁹ A similar behavior was found for the reactions involving sites 2 and 3 in H_3Ur (Fig. S1 and S2, ESI†).

Tryptophan repair by the mono-deprotonated fraction of uric acid (H_2Ur^-)

H_2Ur^- is the dominant acid–base species of uric acid at physiological pH (97.4%). Its acidity is rather low ($\text{p}K_{\text{a}2} = 10.85$), which makes a PT process from H_2Ur^- to $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ unlikely. Assuming that the experimental redox potential of H_nUr^q and oxidized Trp at pH 7 correspond to the main fractions at this pH, *i.e.*, H_2Ur^-

and $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$, a SET reaction between them should be slightly thermodynamically favored ($E_{\text{cell}} = 0.05 \text{ V}$ and $\Delta G_{\text{cell}} = -1.15 \text{ kcal mol}^{-1}$). However, the calculated value for the SET reaction between these particular species is significantly different ($17.22 \text{ kcal mol}^{-1}$, Table 2). Moreover, such a difference is much larger, by far, than the expected inaccuracies associated with calculations. Therefore, there must be another explanation for such a large discrepancy. One possible explanation is that experimental values, at a given pH, arise from contributions of all the present species to the observed property; thus, to separate those contributions in independent reactions is not necessarily straightforward. On the other hand, theoretical calculations are usually useful for analysing separated species; hopefully, this might be one of the main contributions of this work.

Based on the experimental redox potentials, it might seem that an electron transfer from H_2Ur^- to $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ is possible. This would cause the $\text{p}K_{\text{a}2}$ of H_2Ur^- to fall from 10.85 to 3.1,⁴⁵ and that the $\text{p}K_{\text{a}}$ of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ increases from 4.7 to ~ 16 . Accordingly, a PT step would become favorable, making the EPST mechanism a viable reaction pathway. However, the analyses provided subsequently strongly indicate otherwise. They also suggest that directly using macroscopic experimental data for inferring properties of chemical systems that present a rich acid–base behavior should be done with caution. Moreover, it is recommended to consider acid–base micro-equilibria when investigating such systems. In other words, assuming that the most abundant species (at a specific pH) makes the largest contribution to a particular measured property is not always a valid approach. This has been widely demonstrated, for example, for the free radical scavenging activity of antioxidants.^{47–49,67}

The results on the Hirshfeld spin densities and NPA atomic charges along the reaction coordinates of the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{H}_2\text{Ur}^-$ reaction are shown in Fig. 2 and 3. They indicate that the reaction proceeds through a PEST mechanism, when site 2 in uric acid is involved. On the other hand, when the reaction site is 3, the most likely mechanism is PCET.

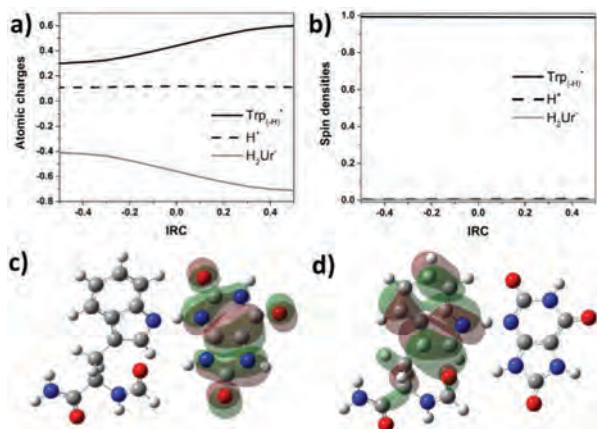


Fig. 1 Information on the reaction involved in the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by H_3Ur (site 1). NPA atomic charge (a) and Hirshfeld spin density (b) along the reaction coordinate, HOMO (c) and SOMO (d) density surfaces (computed with isodensity value of 0.02 a.u.) at the transition state geometry.

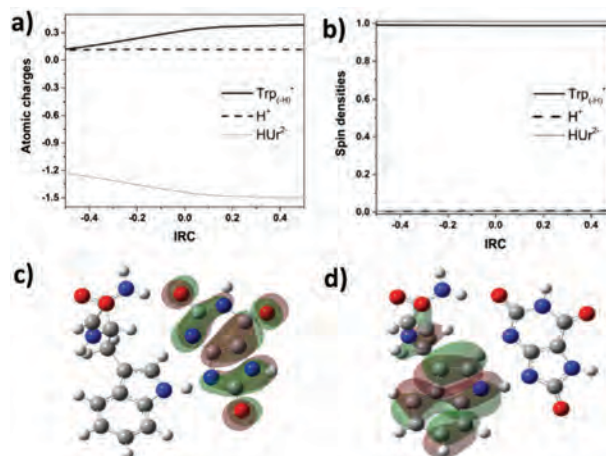


Fig. 2 Information on the reaction involved in the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by H_2Ur^- (site 2). NPA atomic charge (a) and Hirshfeld spin density (b) along the reaction coordinates, HOMO (c) and SOMO (d) density surfaces (computed with isodensity value of 0.02 a.u.) at the transition state geometry.

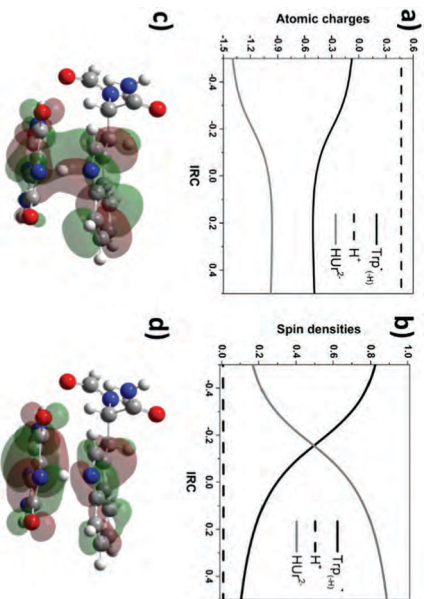


Fig. 3 Information on the reaction involved in the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ by H_2Ur^- (site 3). NPA atomic charge (a) and Hirshfeld spin density (b) along the reaction coordinates. HOMO (c) and SOMO (d) density surfaces (computed with isodensity value of 0.02 a.u.) at the transition state geometry.

When the reaction involves site 2, the nucleus is transferred as a proton in the first step. This is a logical finding, considering that this site corresponds to the second deprotonation of uric acid. The NPA atomic charge and Hirshfeld spin density (on H) along the reaction coordinates are $\sim 0.5 e$ and $0.004\text{--}0.006$, respectively (Fig. 2). This is in apparent contradiction to the pK_a values of the reacting species, and with the calculated ΔG_{PT} value ($16.02 \text{ kcal mol}^{-1}$, Table S2 in ESI[†]). However, the following step, *i.e.*, SET reaction $[\text{Trp}^{\bullet+} \cdots \text{HU}_2\text{U}^{2-}] \rightarrow [\text{Trp} \cdots \text{HU}_2\text{U}^{\bullet-}]$ occurs quickly ($\Delta G_{\text{SET}}^{\ddagger} = 0.78 \text{ kcal mol}^{-1}$, Table 5) and is significantly exergonic ($\Delta G_{\text{SET}} = -21.16 \text{ kcal mol}^{-1}$, Table 5). Therefore, the second step provides the necessary driving force for the overall reaction (PEST) to become viable. The corresponding reaction profile is presented in the ESI[†] (Fig. S3). In addition, the HOMO and SOMO at the TS geometry are located over the donor and acceptor respectively, which is consistent with a sequential mechanism where the first step corresponds to a PT reaction (Fig. 2). This behavior confirms the PEST mechanism as the most likely one for the reaction involving site 2, which is in line with the lower electron accepting capacity of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$, compared to $\text{Trp}^{\bullet+}$. Additionally, the electron donor capacity of H_2Ur^- significantly increases when it is transferred into HU_2U^{2-} (first step, PT). Therefore, the increase in electron acceptor and donor capacities of reagents are identified as the key factors for the PEST mechanism to occur. However, the contributions of the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{H}_2\text{Ur}^-$ reaction to the overall repair process of tryptophan by uric acid is expected to be low, due to the large positive Gibbs energy associated with the first (PT) step in the PEST mechanism.

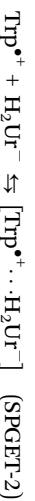
The reaction pathway involving site 3 in H_2Ur^- is different from those already analysed, in that the corresponding transition state presents a π - π stacked structure. This structural feature is expected to influence the dominant reaction mechanism.⁶⁶ It was found that in this case, the NPA charge and spin density on the transferred nucleus are $\sim 0.5 e$ and $0.007\text{--}0.010$, respectively (Fig. 3). This indicates that the nucleus is transferred as a proton. However, contrary to what was found for site 2, the spin densities for the acceptor and donor gradually switch, which indicates a

PCET mechanism. The spin density values fall from 0.797 to 0.111 and rise from 0.196 to 0.880 for the acceptor and the donor, respectively, while at the TS geometry they are 0.284 and 0.706. Those values show that at there is significant electron delocalization in the TS, and along the reaction coordinates, which is the key feature of a PCET process. This mechanism is also supported by the HOMO and SOMO surfaces (Fig. 3). The HOMO π - π stacking interaction provides a SET channel through which the e^- and H^+ are simultaneously, but separately, transferred.⁶⁶ Therefore, it is proposed that the π - π stacking interaction in the TS is responsible for the dominance of the PCET mechanism over the PEST (site 2 in H_2Ur^- , and all sites in H_3Ur).

In addition to the PEST and PCET mechanisms proposed for reactions of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ with H_2Ur^- , a third new sequential mechanism is proposed. This is referred to as a sequential proton gain-electron transfer (SPGET). In its first elementary step, $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet}$ gains one proton from the solvent yielding $\text{Trp}^{\bullet+}$ and increases its electron affinity:



The second elementary step corresponds to the formation of a complex:



In turn, this complex is involved in a third elementary step, the SET from H_2Ur^- to $\text{Trp}^{\bullet+}$:



Finally, $[\text{Trp} \cdots \text{H}_2\text{Ur}^{\bullet}]$ dissociates to form the repaired Trp and $\text{H}_2\text{Ur}^{\bullet}$ radical.

In a recent publication, we referred to SPGET as proton solvent assisted electron transfer ($\text{SP}_{\text{SAET}}\text{T}$)⁴⁹ but SPGET is suggested as a better name. SPGET can be considered as the counterpart of the SPLET mechanism, except that in SPGET the proton exchange involves the radical species, while in SPLET it involves the antioxidant. Therefore, in the SPLET mechanism the PL step modulates the antioxidant redox potential, while in SPGET the PG step modulates the free radical redox potential, *i.e.*, deprotonation increases the electron donor capacity and protonation increases electron acceptor capacity. In the kinetic analysis section, it will be demonstrated that the SPGET mechanism is important to properly interpret the experimental kinetic data reported by Domazou *et al.* for the repair of tryptophanyl radicals by uric acid.^{20,88}

Tryptophan repair by the bi-deprotonated fraction of uric acid (HU_2U^{2-})

As previously discussed, the molar fraction of HU_2U^{2-} is very low under physiological conditions. Thus, reaction pathways involving this species are not expected to make important contributions to the overall repair of tryptophan by uric acid. However, the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^{\bullet} + \text{HU}_2\text{U}^{2-}$ reaction is analyzed in this section because its behavior, regarding the mechanism involved, is particularly interesting.

HUr^{2-} is the best electron donor of the acid–base species of uric acid (E_0' vs. NHE = 0.26 V at pH = 13).⁴⁵ Consequently, the SET from HUr^{2-} to $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ (E_0' vs. NHE = 0.56 V, at pH = 13) is thermodynamically favored ($E_{\text{cell}} = 0.30$ V, $\Delta G_{\text{cell}} = -6.92$ kcal mol⁻¹). This is another case, where the ΔG value derived from the experimental redox potential for the macroscopic system and the calculated value for the most abundant species (at the pH of interest) do not agree.

Fig. 4 shows the IRC profile for the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{HUr}^{2-}$ (site 3) reaction. This is a very peculiar profile, with two clearly distinct regions. The first one, from point A to B in the figure, corresponds to an early stage of the reaction when the two reactants are rather apart (reaction coordinate from -15.6 to -9.3). According to the results shown in Fig. 5, it can be associated with an electron transfer (SET) from HUr^{2-} to $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$. Within this region the spin density of the e^- acceptor falls from 0.841 to 0.260 and that of the e^- donor increases from 0.156 to 0.732, while it remains almost constant for the transferred nucleus (0.002–0.008). The charge on the transferred H is around $\sim 0.5 e$ along the entire reaction path. Both features indicate that this early stage is consistent with a SET process, and the gradual switching indicates that electron delocalization is important.

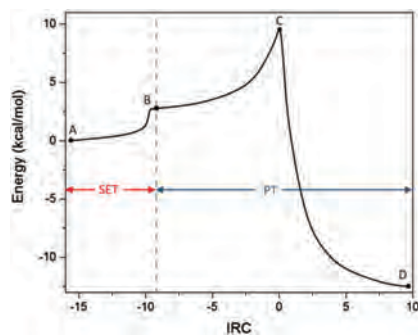


Fig. 4 Intrinsic reaction coordinates (IRC) for the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{HUr}^{2-}$ (site 3) reaction.

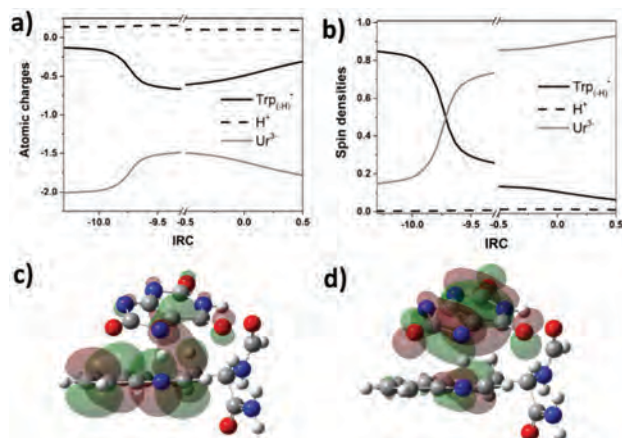


Fig. 5 Information on the reaction involved in the repair of $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ by HUr^{2-} (site 3). NPA atomic charge (a) and Hirshfeld spin density (b) along the reaction coordinates, HOMO (c) and SOMO (d) density surfaces (computed with isodensity value of 0.02 a.u.) at the transition state geometry.

The second region, from point B to D, in Fig. 4 (which includes the TS) can be better characterized as a PT region. Around the TS (reaction coordinate values from -0.5 to 0.5), the evolution of the atomic charge and the spin density are $\sim 0.5 e$ and 0.009–0.012 for the transferred H, respectively (Fig. 5).

At this point, it seems worthwhile to discuss in more detail the energy profile associated with the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{HUr}^{2-}$ (site 3) reaction. At first sight, one might conclude incorrectly that this reaction involves two consecutive steps. However, this would imply the formation of a proper intermediate at the end of the first stage. What the gradient norm variation through the IRC actually indicates (Fig. S4, ESI[†]) is that there is a hidden intermediate almost immediately after point B in Fig. 4.⁸⁹ This points out that the whole profile shown in this figure corresponds to a single step reaction, not a sequential one, which rules out the EPST mechanism. At the same time, the clear separation between the electron and the proton transfer clearly excludes HAT as a possible reaction mechanism. Therefore, the only appropriate classification for the $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet + \text{HUr}^{2-}$ (site 3) reaction seems to be PCET. However, this would be a PCET reaction with an atypically large asynchrony.⁹⁰ Another interesting feature of the reaction is the evolution, along the reaction path, of the distance between the H donor (N3 in HUr^{2-}) and the H acceptor (N atom in the side chain of tryptophan) (Fig. S5, ESI[†]). In addition to the deepest well corresponding to the TS (distance ~ 2.5 Å), it also presents a shallower well (distance = 3.0 Å) that corresponds to the hidden intermediate. This is a peculiarity that can also be related to the presence of a hidden intermediate.

The reaction involving site 4 in HUr^{2-} has a conventional behavior, *i.e.*, without hidden intermediates. The values of the NPA charge and the Hirshfeld spin density on the transferred H are $\sim 0.5 e$ and 0.001, respectively (Fig. S6, ESI[†]). At the TS geometry, the HOMO and SOMO are mainly located on the H acceptor and donor, respectively. These features are in line with a process where the SET occurs before PT, *i.e.*, to the EPST mechanism.

A summary of the reaction mechanisms identified in the mechanistic analysis is presented in Table 3. It details the acid–base species of the reactants, the reaction steps, and the reaction sites involved in each mechanism. The reaction between $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ and H_3Ur is predicted to occur through a PEST mechanism for all three NH sites in H_3Ur . On the other hand, the most likely mechanism for the reaction between $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ and H_2Ur^- depends on the reaction site in H_2Ur^- . For site 2, the reaction mechanism is PEST, while for site 3, it corresponds to PCET. A similar behavior was found for the reaction between $\text{Trp}_{(-\text{H})}^\bullet$ and HUr^{2-} , *i.e.*, the dominant mechanism depends on the reaction site. In this case, PCET and EPST are predicted as the most likely mechanisms for sites 3 and 4, respectively. However, reactions involving the HUr^{2-} are not expected to be important at physiological (or lower) pH, because its molar fraction would be too low under such conditions. Therefore, it is not necessary to consider this species in the kinetics analyses. In addition, for the $\text{Trp}^{\bullet+} + \text{H}_2\text{Ur}^-$ reaction, the SPGET mechanism (Fig. 6) was identified as the dominant one. It should be noted that this chemical route

Table 3 Summary of the reaction mechanisms found in this work for the reaction between the tryptophanyl radical and uric acid. Reactant fractions and elementary reaction steps are presented in detail

| Radical | H _n Ur ^q | Reactive NH ^a | Reaction mechanism | Reaction steps | Scheme |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trp _(-H) [•] | H ₃ Ur | Site 1 Site 2 Site 3 | Proton–electron sequential transfer | 1 2 3 4 | Trp _(-H) [•] + H ₃ Ur ⇌ [Trp _(-H) [•] ⋯H ₃ Ur] [Trp _(-H) [•] ⋯H ₃ Ur] ⇌ [Trp ^{•+} ⋯H ₂ Ur ⁻] [Trp ^{•+} ⋯H ₂ Ur ⁻] ⇌ [Trp⋯H ₂ Ur [•]] [Trp⋯H ₂ Ur [•]] → Trp + H ₂ Ur [•] |
| Trp _(-H) [•] | H ₂ Ur ⁻ | Site 2 Site 3 | Proton–electron sequential transfer Proton-coupled electron transfer | 1 2 3 4 1 | Trp _(-H) [•] + H ₂ Ur ⁻ ⇌ [Trp _(-H) [•] ⋯H ₂ Ur ⁻] [Trp _(-H) [•] ⋯H ₂ Ur ⁻] ⇌ [Trp ^{•+} ⋯HU ²⁻] [Trp ^{•+} ⋯HU ²⁻] → [Trp⋯HU ^{•-}] [Trp⋯HU ^{•-}] → Trp + HU ^{•-} Trp _(-H) [•] + H ₂ Ur ⁻ → Trp + HU ^{•-} |
| Trp _(-H) [•] | HUr ²⁻ | Site 3 Site 4 | Proton-coupled electron transfer Electron–proton sequential transfer | 1 1 2 | Trp _(-H) [•] + HUr ²⁻ → Trp + Ur ^{2-•} Trp _(-H) [•] + HUr ²⁻ → Trp _(-H) ⁻ + HU ^{•-} Trp _(-H) ⁻ + HU ^{•-} → Trp + Ur ^{2-•} |
| Trp ^{•+} | H ₂ Ur ⁻ | na | Sequential proton gain–electron transfer | 1 2 3 4 | Trp _(-H) [•] + H ₃ O ⁺ ⇌ Trp ^{•+} + H ₂ O Trp ^{•+} + H ₂ Ur ⁻ ⇌ [Trp ^{•+} ⋯H ₂ Ur ⁻] [Trp ^{•+} ⋯H ₂ Ur ⁻] → [Trp⋯H ₂ Ur [•]] [Trp⋯H ₂ Ur [•]] → Trp + H ₂ Ur [•] |

^a Reaction sites for H_nUr^q, Scheme 3.

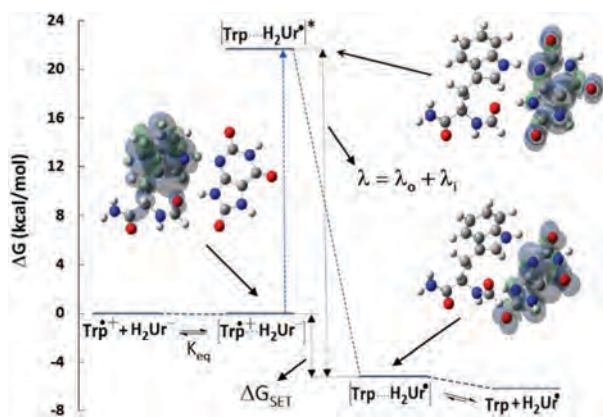


Fig. 6 Pre-equilibrium reaction and parameters used in the kinetic analyses of the SPGET mechanism between Trp^{•+} and H₂Ur⁻. Structures and spin densities are shown. The first elementary (SPGET-1) corresponding to the protonation of Trp_(-H)[•] is not included.

has not been considered before, *i.e.*, it is proposed in this work for the first time.

Kinetics

Following the QM-ORSA methodology,⁶⁷ every possible reactive site was considered. However, only those reaction pathways previously described as thermochemically feasible are included in the kinetic calculations. There are four, three and two sites in H₃Ur and, H₂Ur⁻ and HU²⁻ that may act as H donors in the FHT mechanism (Scheme 3 and Table 1). However, the HU²⁻ species was not included in the kinetic analyses because of its very low fraction at the pH of interest (3.5×10^{-4} , at pH = 7.4). The calculated rate constants are presented in Table 4, while detailed analyses of sequential (PEST and SPGET) and concerted FHT reactions are provided in the following sections. Activation free energies (ΔG^\ddagger) used to calculate rate constants in

Table 4 Rate constants ($k^{(\text{pH}=7.4)}$, M⁻¹ s⁻¹) and their contributions to the overall reaction (Γ , %), at 298.15 K, for the reaction mechanisms involved in the repair of Trp radicals by H_nUr^q

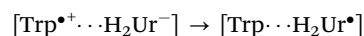
| Trp radical | H _n Ur ^q | Mechanism ^a | $k^{(\text{pH}=7.4)}$ | Γ |
|----------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
| Trp _(-H) [•] | H ₃ Ur (site 1) | PEST | 1.77×10^7 | 85.34 |
| | H ₃ Ur (site 2) | PEST | 8.93×10^5 | 4.31 |
| | H ₃ Ur (site 3) | PEST | 3.96×10^3 | 0.02 |
| | H ₂ Ur ⁻ (site 2) | PEST | 1.12×10^1 | 0.00 |
| | H ₂ Ur ⁻ (site 3) | PCET | 9.44×10^2 | 0.00 |
| Trp ^{•+} | H ₂ Ur ⁻ | SPGET | 2.14×10^6 | 10.33 |
| k_{overall} | | | 2.07×10^7 | 100.00 |

^a PEST = proton–electron sequential transfer, PCET = proton-coupled electron transfer, SPGET = sequential proton gain–electron transfer.

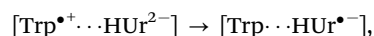
Table 4, are summarized in Table S3 in the ESI.† Note that ΔG^\ddagger values for sequential reactions are the sum of the reaction free energy for the first elementary step and the activation free energy for the second elementary step (Table S3, ESI.†).

Proton–electron sequential transfer (PEST)

The kinetic parameters for the SET elementary steps involved in the PEST mechanism are as follows:



and



have been calculated using the Marcus theory (Table 5). The equilibrium constants for the PT step were found to be responsible for the finding that although H₃Ur (sites 1, 2 and 3) reacts with Trp_(-H)[•] through a PEST mechanism, only the reaction pathway involving site 1 is important ($K_{\text{PT-N1}} = 0.462 \text{ M}^{-1}$). This is coherent with the fact that this site corresponds to the first deprotonation of uric acid. Reaction pathways involving

Table 5 Data relevant for the intra-molecular single electron transfer (SET) step in the PEST mechanism, calculated at 298.15 K

| H_nUr^q | NH ^a | K_{PT}^b | ΔG_{SET}^c | λ_i^d | λ_o^e | $\Delta G^{\ddagger,f}$ | k_{SET}^g |
|-----------|-----------------|------------------------|--------------------|---------------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| H_3Ur | 1 | 0.462 | -5.11 | 18.16 | 8.98 | 4.47 | 3.29×10^9 |
| | 2 | 5.08×10^{-3} | -3.25 | 15.13 | 6.80 | 3.98 | 7.53×10^9 |
| | 3 | 7.62×10^{-6} | -7.31 | 17.99 | 7.98 | 3.35 | 2.17×10^{10} |
| H_2Ur^- | 2 | 6.83×10^{-12} | -21.16 | 22.40 | 8.56 | 0.78 | 1.68×10^{12} |

^a Reactive site in the H_3Ur fraction. ^b Equilibrium constants (M^{-1}). ^c Gibbs free energies of reaction ($kcal\ mol^{-1}$). ^d Internal reorganization energies ($kcal\ mol^{-1}$). ^e Solvent reorganization energies ($kcal\ mol^{-1}$). ^f Gibbs free energies of activation ($kcal\ mol^{-1}$). ^g SET rate constants (s^{-1}).

sites 2 and 3 of H_3Ur are less important because they involve less acid nitrogen sites. Therefore, the corresponding proton transfer complexes are higher in energy ($K_{PT-N2} = 5.08 \times 10^{-3} M^{-1}$, $K_{PT-N3} = 7.62 \times 10^{-6} M^{-1}$, Table 5 and Table S2, ESI†). This is relevant in this case because the first step of the PEST mechanism corresponds to a pre-equilibrium reaction and therefore, the apparent rate constant (k_{PEST}) depends on both K_{PT} and k_{SET} , i.e. $k_{PEST} = K_{PT} \cdot k_{SET}$.⁹¹

A similar behavior was found for the reaction pathway involving site 2 in H_2Ur^- . Its contribution to the overall repair process is negligible because the proton transfer complex is rather high in energy ($K_{PT} = 6.83 \times 10^{-12} M^{-1}$, Table 5 and Table S2, ESI†). The PEST profiles for the reactions of $Trp_{(-H)}^\bullet$ with H_3Ur (sites 1, 2 and 3) and H_2Ur^- (site 2) are provided as ESI† (Fig. S7, S8, S9 and S3, respectively).

Sequential proton gain-electron transfer (SPGET)

The results presented in Table 2 indicate that when there is no formation of a reactant complex, there are only two SET reactions that are thermochemically viable. They are those involving $Trp^{\bullet+}$ and H_2Ur^- or HUr^{2-} . However, because of the low abundance of both HUr^{2-} and $Trp^{\bullet+}$, the reaction between them is not expected to occur to a significant extent at physiological pH. Therefore, the $Trp^{\bullet+} + H_2Ur^-$ is the only bimolecular SET reaction that may explain the experimental observations. On the other hand, the $[Trp^{\bullet+} \cdots H_2Ur^-]$ complex formation has a highly favored equilibrium constant ($K_{eq} = 1.25 M^{-1}$) and it is a very fast process ($k_{SET} = 1.68 \times 10^{12} s^{-1}$, Table 5). At pH = 7.4, $Trp_{(-H)}^\bullet$ is the largest fraction of damaged tryptophan and it may gain a proton from solvent to form $Trp^{\bullet+}$, which is a much better electron acceptor than $Trp_{(-H)}^\bullet$. Therefore, to repair $Trp_{(-H)}^\bullet$ at pH 7.4, a proton gain step can take place prior to the SET step. Accordingly, it seems that the SPGET mechanism is the most likely chemical route to explain the repair activity of H_2Ur^- . The corresponding reaction profile is presented in Fig. 6. The spin densities shown in this figure confirm the electron transfer step within the complex.

Proton coupled electron transfer (PCET)

PCET is different from the previously discussed mechanisms (PEST and SPGET) in that it is a concerted process, i.e., it takes place in a single elementary step. Accordingly, the kinetic analyses of PCET is quite different from those concerning sequential

reactions. There is no complex formation involved in PCET, thus the kinetic data is obtained just as described above (computational details). Despite the variety of acid–base species analyzed here, only one PCET reaction was found to be relevant for the tryptophan repair by uric acid, which is the one involving H_2Ur^- and $Trp_{(-H)}^\bullet$ (Table 4). The corresponding rate constant is rather low ($9.44 \times 10^2 M^{-1} s^{-1}$), which allows the anticipation of low contributions to the overall repair of tryptophan by uric acid, under physiological conditions.

Overall repair of tryptophan by uric acid

To calculate the overall rate coefficient ($k_{overall}$) associated with the tryptophan by uric acid, it is necessary to consider the rate constants of all reactions mechanisms significantly contributing to it. In the present case, $k_{overall}$ was estimated as the sum of all the rate constants presented in Table 4. Its value was found to be $2.07 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, which indicates that it is a fast process. Thus, uric acid is efficient for repairing oxidatively-damaged tryptophan. This is an important finding since uric acid is one of the species present in biological systems in relatively high abundance. In addition, the calculated rate coefficient is only 1.09 times higher than the experimental value, $k_{exp} = (1.9 \pm 0.4) \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$.^{20,88} This excellent agreement supports the robustness of the methodology used in this work.

Regarding the contributions of the different reaction mechanisms (Γ , Table 4), the overall tryptophan repair by uric acid can be attributed mostly to two of them. They are the PEST reaction between H_3Ur (site 1) and $Trp_{(-H)}^\bullet$, and the SPGET reaction between H_2Ur^- and $Trp_{(-H)}^\bullet$. Their contributions to $k_{overall}$ were estimated to be 85.34% and 10.33%, respectively. In addition, the PEST reaction between H_3Ur (site 2) and $Trp_{(-H)}^\bullet$ has a small, but not negligible contribution ($\sim 4\%$). On the other hand, none of the other investigated routes are important for the repair of tryptophan by uric acid, under physiological conditions. The large contribution of SPGET to such a process clearly indicates the importance of this newly proposed chemical route. Further investigations on the possible role of this mechanism in other reactions are highly desirable.

Effects of the pH on mechanistic behavior

The influence of the pH on the values of the rate constants is shown in Fig. 7. It is essentially ruled by the changes in the

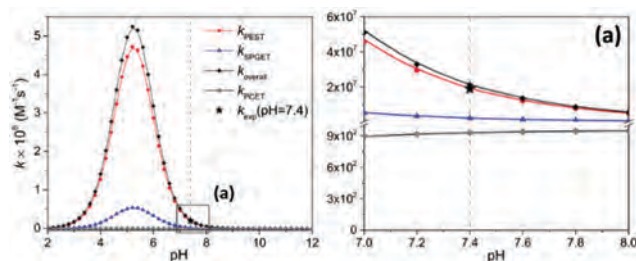


Fig. 7 Influence of the pH on $k_{overall}$ and its two major components (k_{PEST} and k_{SPGET}), at 298.15 K. k_{PCET} represents the rate constant, assuming the previously proposed FHT from H_2Ur^- to $Trp_{(-H)}^\bullet$.²⁰ Gray vertical dashed lines indicate the physiological pH (7.4).

fractions of the different acid–base species involved in the investigated process. The experimental value of the overall rate coefficient,^{20,88} at physiological pH, was included in this figure for comparison purposes. The agreement with the value calculated, assuming the mechanisms proposed here, is clearly shown in this figure. However, the maximum repairing ability of uric acid is expected to arise at a more acidic pH (pH \sim 5.0), with overall rate constants that are predicted to be within the diffusion-limited regime. The last point is especially relevant to cellular compartments such as endosomes (pH = 5.5–6.0) and lysosomes (pH = 4.5–5.0), as well as for the killing mechanism of macrophages, which has been proposed to be the phagosome acidification to pH < 5.0.^{92–94}

It seems important to note that the species involved in the fastest reactions are not the most abundant ones at physiological pH. As discussed in the previous section, PEST and SPGET combined account for more than 99% of the overall reaction at pH = 7.4, despite the fact that they involve minor species, *i.e.*, H₃Ur (site 1, PEST) and Trp^{•+}, respectively. In contrast, the dominant species at pH = 7.4 (H₂Ur[−] and Trp_{(−H)}[•]) have been previously assumed as the ones involved in the tryptophan repair by uric acid.²⁰ Therefore, additional calculations using this assumption have been performed to obtain the corresponding rate constant (k_{PCET} , Fig. 7). This result shows that such an assumption would lead to a rate constant about 4 orders of magnitude lower than the experimental value. Such a large discrepancy rules out the possibility that the direct reaction between the most abundant fractions of the reactants is the chemical route contributing the most to the overall process of repairing damaged tryptophan by uric acid. Moreover, such a hypothetical route would lead to a rate constant that dramatically disagrees with the experimentally measured value. These results also demonstrate the crucial importance of considering all the acid–base species of chemical reactants when performing kinetic calculations. Otherwise, large discrepancies between experimental and calculated data might arise. For example, for the reaction investigated in this work, the experimental rate constant reports by Domazou *et al.*²⁰ are reproduced only if minor species are included in the modeling.}

Although at pH = 7.4 the chemical route proposed here leads to a rate constant that agrees well with the experimental value at this pH ($k_{\text{exp}} = (1.9 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{20,88} an experimental confirmation would be desirable. In fact, there is a relatively easy way to decide which chemical route is the correct one, *i.e.*, that proposed here, or the previously proposed one. A new plot was constructed (Fig. 8), assuming that the measured rate constant actually involves the most abundant species (k_{exp} or k_{hyp}), and it is compared with the equivalent plot for the complex mechanism proposed here (k_{overall}). According to this figure, while both plots almost intersect at pH = 7.4, at more acidic pH values they go significantly apart (Table S2, ESI†). Therefore, future experiments performed under such conditions (pH = 5, for instance) would allow the definitive demonstration of which chemical route is more likely: (i) the previously proposed FHT from H₂Ur[−] to Trp_{(−H)}[•], or (ii) the more complex route governed by PEST and SPGET, proposed here.}

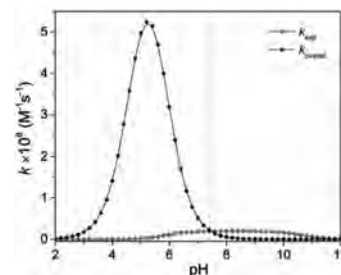


Fig. 8 Influence of the pH on k_{overall} , at 298.15 K, assuming (i) the previously proposed FHT from H₂Ur[−] to Trp_{(−H)}[•] (k_{exp} or k_{hyp}); or (ii) the more complex route governed by PEST and SPGET (k_{overall}), proposed here.}

Conclusions

The results presented in this work demonstrate the high complexity of chemical reactions involving species with multiple acid–base equilibria. In general, it can be stated that to unequivocally assess the dominant reaction mechanism, it is necessary to consider all the fractions of the reactants at the pH of interest, as well as all possible reaction sites and mechanisms.

In the particular case of formal H transfer reactions, mechanistic analyses may require the investigation of spin densities and atomic charges for the donor, acceptor and transferred nucleus as a function of the reaction coordinates, as well as the inspection of HOMO and SOMO orbitals. Specifically, for the case study investigated here, *i.e.*, the repair of oxidized tryptophan by uric acid, it was necessary to consider two radical species for the former (Trp_{(−H)}[•] and Trp^{•+}) and three fractions for the latter (H₃Ur, H₂Ur[−] and HU^{2−}); otherwise, the experimental results cannot be properly reproduced.}

At pH 7.4, the repairing activity of uric acid is explained by two main reaction mechanisms: proton–electron sequential transfer (PEST) and sequential proton gain–electron transfer (SPGET). Considering both, the calculated overall rate constant has an excellent agreement with the experimentally measured value, $k_{\text{overall}} = 2.07 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{exp}} = (1.9 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.²⁰

It seems worthwhile to emphasize the finding concerning the relative importance of the different fractions of the reactants on the overall process. The species involved in the fastest reactions are not the most abundant ones at physiological pH. PEST and SPGET combined account for more than 99% of the overall reaction, despite the involvement of minor species, *i.e.*, H₃Ur (site 1, PEST) and Trp^{•+}, respectively. In contrast, considering only the dominant species at pH = 7.4 (H₂Ur[−] and Trp_{(−H)}[•]), there would be a large discrepancy with the experimental value (about 4 orders of magnitude).}

Another interesting finding, arising from this investigation, is that the reaction mechanisms most frequently assumed as responsible for FHT do not significantly contribute to the overall reaction between oxidized tryptophan and uric acid. On the contrary, the main reaction mechanisms involved in such reactions are seldom considered, regarding radical–molecule reactions.

The influence of the pH on the kinetics of the investigated reaction was also explored. It was found that the maximum repairing ability of uric acid does not occur at physiological pH,

but at a more acidic one (pH \sim 5.0). Under such conditions, the overall rate constant is predicted to be within the diffusion-limited regime, and about 24 times larger than at pH = 7.4.

Acknowledgements

This work was partially supported by a grant from the DGAPA UNAM PAPIIT IN220215 and LANCAD-UNAM-DGTIC-192. L. M.-R. thanks CONACyT for scholarship 270309.

References

- M. L. Posener, G. E. Adams, P. Wardman and R. B. Cundall, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1976, **72**, 2231–2239.
- J. Baugher and L. Grossweiner, *J. Phys. Chem.*, 1977, **8**, 1349–1354.
- X. Shen, J. Lind and G. Merenyi, *J. Phys. Chem.*, 1987, **91**, 4403–4406.
- Z. Maskos, J. D. Rush and W. H. Koppenol, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **296**, 514–520.
- L. P. Candeias, P. Wardman and R. P. Mason, *Biophys. Chem.*, 1997, **67**, 229–237.
- E. L. Finley, J. Dillon, R. K. Crouch and K. L. Schey, *Protein Sci.*, 1998, **7**, 2391–2397.
- M. Sjödin, S. Styring, H. Wolpher, Y. Xu, L. Sun and L. Hammarström, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3855–3863.
- K. Huvaere and L. H. Skibsted, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 8049–8060.
- H. S. Shafaat, B. S. Leigh, M. J. Tauber and J. E. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 9030–9039.
- D. I. Pattison, A. S. Rahmanto and M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 38–53.
- M. Ehrenshaft, L. J. Deterding and R. P. Mason, *Free Radical Biol. Med.*, 2015, **89**, 220–228.
- S. Chen and M. Z. Hoffman, *Radiat. Res.*, 1973, **56**, 40–47.
- A. Perez-Gonzalez, L. Muñoz-Rugeles and J. R. Alvarez-Idaboy, *Theor. Chem. Acc.*, 2016, **135**, 155.
- A. S. Domazou, L. Gebicka, J. Didik, J. L. Gebicki, B. van der Meijden and W. H. Koppenol, *Free Radical Biol. Med.*, 2014, **69**, 172–180.
- R. E. Huie and P. Neta, *J. Phys. Chem.*, 1986, **90**, 1193–1198.
- M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, *Chem.-Biol. Interact.*, 2006, **160**, 1–40.
- K. Jomova and M. Valko, *Toxicology*, 2011, **283**, 65–87.
- E. Deas, N. Cremades, P. R. Angelova, M. H. R. Ludtmann, Z. Yao, S. Chen, M. H. Horrocks, B. Banushi, D. Little, M. J. Devine, P. Gissen, D. Klenerman, C. M. Dobson, N. W. Wood, S. Gandhi and A. Y. Abramov, *Antioxid. Redox Signaling*, 2016, **24**, 376–391.
- M. Hony and J. Butler, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1984, **791**, 212–218.
- A. S. Domazou, H. Zhu and W. H. Koppenol, *Free Radical Biol. Med.*, 2012, **52**, 1929–1936.
- K.-L. Chien, H.-C. Hsu, F.-C. Sung, T.-C. Su, M.-F. Chen and Y.-T. Lee, *Atherosclerosis*, 2005, **183**, 147–155.
- M. J. Bos, P. J. Koudstaal, A. Hofman, J. C. M. Witteman and M. M. B. Breteler, *Stroke*, 2006, **37**, 1503–1507.
- A. Hozawa, A. R. Folsom, H. Ibrahim, F. J. Nieto, W. D. Rosamond and E. Shahar, *Atherosclerosis*, 2006, **187**, 401–407.
- S. Y. Kim, J. P. Guevara, K. M. Kim, H. K. Choi, D. F. Heitjan and D. A. Albert, *Arthritis Rheum.*, 2009, **61**, 885–892.
- A. Chamorro, V. Obach, A. Cervera, M. Revilla, R. Deulofeu and J. H. Aponte, *Stroke*, 2002, **33**, 1048–1052.
- H. R. Lucas, S. Debeer, M.-S. Hong and J. C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6636–6637.
- R. C. S. Seet, K. Kasiman, J. Gruber, S.-Y. Tang, M.-C. Wong, H.-M. Chang, Y.-H. Chan, B. Halliwell and C. P. Chen, *Atherosclerosis*, 2010, **209**, 215–219.
- Y. Yang, Q. Liu, Z. Wu, X. Li, C. Deng and S. Zhou, *Int. J. Cardiol.*, 2016, **203**, 624–625.
- M. G. Weisskopf, E. O'Reilly, H. Chen, M. A. Schwarzschild and A. Ascherio, *Am. J. Epidemiol.*, 2007, **166**, 561–567.
- S. Cipriani, X. Chen and M. A. Schwarzschild, *Biomarkers Med.*, 2010, **4**, 701–712.
- X. Gao, E. J. O'Reilly, M. A. Schwarzschild and A. Ascherio, *Neurology*, 2016, **86**, 520–526.
- S. Paganoni, M. Zhang, A. Quiroz Zárate, M. Jaffa, H. Yu, M. E. Cudkowicz and A.-M. Wills, *J. Neurol.*, 2012, **259**, 1923–1928.
- Y.-W. Lin, T.-S. Lin and M.-L. Lai, *J. Clin. Med. Res.*, 2013, **1**, 35–39.
- D. Hu and D. A. Pratt, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3711–3713.
- A. Abraham and V. E. Drory, *J. Neurol.*, 2014, **261**, 1133–1138.
- Z. Zheng, X. Guo, Q. Wei, W. Song, B. Cao, R. Huang, R. Ou, X. Chen and H. Shang, *Metab. Brain Dis.*, 2014, **29**, 771–775.
- B. Cao, Q.-Q. Wei, R. Ou, J. Yang and H.-F. Shang, *J. Neurol. Sci.*, 2015, **359**, 363–366.
- S. I. Oh, S. Baek, J. S. Park, L. Piao, K. W. Oh and S. H. Kim, *J. Clin. Neurol.*, 2015, **11**, 376–382.
- N. Du, D. Xu, X. Hou, X. Song, C. Liu, Y. Chen, Y. Wang and X. Li, *Mol. Neurobiol.*, 2016, **53**, 2594–2599.
- B. S. Ye, W. W. Lee, J. H. Ham, J. J. Lee, P. H. Lee and Y. H. Sohn, *Eur. J. Neurol.*, 2016, **23**, 948–957.
- M.-T. Zhang and L. Hammarström, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 8806–8809.
- H. D. Connor, B. E. Sturgeon, C. Mottley, H. J. Sipe and R. P. Mason, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6381–6387.
- S. Stoll, H. S. Shafaat, J. Krzystek, A. Ozarowski, M. J. Tauber, J. E. Kim and R. D. Britt, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 18098–18101.
- A. Perez-Gonzalez, L. Muñoz-Rugeles and J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 56128–56131.
- M. G. Simic and S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 5778–5782.
- K. Kahn, P. Serfozo and P. Tipton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **7863**, 5435–5442.
- A. Galano, J. R. Alvarez-Idaboy and M. Francisco-Márquez, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 13101–13109.
- A. Galano, *J. Mex. Chem. Soc.*, 2015, **59**, 231–262.

- 49 L. Muñoz-Rugeles and J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 28525–28528.
- 50 A. Sirjoosingh and S. Hammes-Schiffer, *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 2367–2377.
- 51 S. Hammes-schiffer, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 1881–1889.
- 52 G. A. DiLabio and E. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 6199–6203.
- 53 S. Hammes-Schiffer, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 273–281.
- 54 J. M. Mayer, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**, 363–390.
- 55 G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3433–3438.
- 56 G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 5888–5896.
- 57 G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 8982–8990.
- 58 G. Litwinienko and K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 222–230.
- 59 A. Kalume, L. George, N. Cunningham and S. A. Reid, *Chem. Phys. Lett.*, 2013, **556**, 35–38.
- 60 M. J. Frisch; G. W. Trucks; H. B. Schlegel; G. E. Scuseria; M. A. Robb; J. R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; B. Mennucci; G. A. Petersson; H. Nakatsuji; M. Caricato; X. Li; H. P. Hratchian; A. F. Izmaylov; J. Bloino; G. Zheng; J. L. Sonnenberg; M. Hada; M. Ehara; K. Toyota; R. Fukuda; J. Hasegawa; M. Ishida; T. Nakajima; Y. Honda; O. Kitao; H. Nakai; T. Vreven; J. A. Montgomery Jr.; J. E. Peralta; F. Ogliaro; M. J. Bearpark; J. Heyd; E. N. Brothers; K. N. Kudin; V. N. Staroverov; R. Kobayashi; J. Normand; K. Raghavachari; A. P. Rendell; J. C. Burant; S. S. Iyengar; J. Tomasi; M. Cossi; N. Rega; N. J. Millam; M. Klene; J. E. Knox; J. B. Cross; V. Bakken; C. Adamo; J. Jaramillo; R. Gomperts; R. E. Stratmann; O. Yazyev; A. J. Austin; R. Cammi; C. Pomelli; J. W. Ochterski; R. L. Martin; K. Morokuma; V. G. Zakrzewski; G. A. Voth; P. Salvador; J. J. Dannenberg; S. Dapprich; A. D. Daniels; Ö. Farkas; J. B. Foresman; J. V. Ortiz; J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2009.
- 61 Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, **2**, 364–382.
- 62 A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 6378–6396.
- 63 G. A. Dilabio and K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 6693–6699.
- 64 A. E. Reed, R. B. Weinstock and F. Weinhold, *J. Phys. Chem.*, 1985, **83**, 735–746.
- 65 F. L. Hirshfeld, *Theor. Chem. Acc.*, 1977, **44**, 129–138.
- 66 L. Muñoz-Rugeles, A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 6969–6972.
- 67 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.*, 2013, **34**, 2430–2445.
- 68 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *RSC Adv.*, 2011, **1**, 1763–1771.
- 69 J. R. León-Carmona and A. Galano, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 4538–4546.
- 70 A. Galano, D. X. Tan and R. J. Reiter, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 5220–5227.
- 71 A. Galano and A. Martínez, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 1200–1208.
- 72 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.*, 2014, **35**, 2019–2026.
- 73 H. Eyring, *J. Chem. Phys.*, 1935, **3**, 107–115.
- 74 M. G. Evans and M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.*, 1935, **31**, 875–894.
- 75 D. G. Truhlar, W. L. Hase and J. T. Hynes, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 2664–2682.
- 76 D. G. Truhlar and A. Kuppermann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 1840–1851.
- 77 R. A. Marcus, *Rev. Mod. Phys.*, 1993, **65**, 599–610.
- 78 R. A. Marcus, *Pure Appl. Chem.*, 1997, **69**, 13–30.
- 79 R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 1985, **811**, 265–322.
- 80 M. V. Basilevsky, I. V. Rostov and M. D. Newton, *Chem. Phys.*, 1998, **232**, 189–199.
- 81 M. Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.*, 1917, **92**, 129–168.
- 82 D. G. Truhlar, *J. Chem. Educ.*, 1985, **62**, 104–106.
- 83 G. G. Stokes, *Mathematical and Physical Papers*, Cambridge University Press, Cambridge, 1903, vol. 3, p. 55.
- 84 A. Einstein, *Ann. Phys.*, 1905, **17**, 549–560.
- 85 K. Kahn, P. Serfozo and P. A. Tipton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5435–5442.
- 86 J. J. Warren, T. A. Tronic and J. M. Mayer, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 6961–7001.
- 87 S. V. Jovanovic, A. Harriman and M. G. Simic, *J. Phys. Chem.*, 1986, **90**, 1935–1939.
- 88 A. S. Domazou, J. M. Gebicki, T. Nauser and W. H. Koppenol, *Isr. J. Chem.*, 2014, **54**, 254–264.
- 89 H. S. Rzepa and C. Wentrup, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 7565–7574.
- 90 O. Tishchenko, D. G. Truhlar, A. Ceulemans and M. T. Nguyen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 7000–7010.
- 91 A. Galano and J. Raúl Alvarez-Idaboy, *Adv. Quantum Chem.*, 2008, **55**, 245–274.
- 92 J. R. Casey, S. Grinstein and J. Orlowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, **11**, 50–61.
- 93 W. K. E. Ip, A. Sokolovska, G. M. Charriere, L. Boyer, S. Dejardin, M. P. Cappillino, L. M. Yantosca, K. Takahashi, K. J. Moore, A. Lacy-Hulbert and L. M. Stuart, *J. Immunol.*, 2010, **184**, 7071–7081.
- 94 J. A. Mindell, *Annu. Rev. Physiol.*, 2012, **74**, 69–86.



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2017, 19, 6969

Received 17th December 2016,
Accepted 20th February 2017

DOI: 10.1039/c6cp08610a

rsc.li/pccp

Non-covalent π – π stacking interactions turn off non-adiabatic effects in proton-coupled electron transfer reactions†

Leonardo Muñoz-Rugeles,^a Annia Galano^b and J. Raúl Alvarez-Idaboy^{*a}

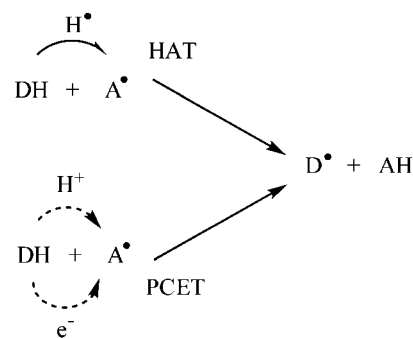
π – π stacking interactions do not necessarily change the mechanism involved in the H transfer reaction between phenol and phenoxyl radicals. We propose that, in such cases, the e^- is transferred between the π delocalized moieties, while the H^+ is transferred between the donor and acceptor atoms.

Formal hydrogen transfer (FHT) reactions in which at least one hydrogen atom (H^\bullet) is transferred between two or more chemical species are crucial in energetic, synthetic and biochemical processes.^{1–3} Considering that H^\bullet are composed of one electron (e^-) and one proton (H^+), two concerted mechanisms have been proposed for FHT reactions: hydrogen atom transfer (HAT) and proton-coupled electron transfer (PCET).⁴ HAT and PCET mechanisms are fundamentally different in how the e^- and H^+ are transferred: that is, as a single entity (H^\bullet) in HAT or as two separated subatomic entities in PCET (one e^- and one H^+), Scheme 1 (those correspond to the definitions used in this work for PCET and HAT mechanisms). Consequently, differentiation between HAT and PCET becomes a challenging task and quantum-mechanics calculations of molecular orbitals, spin densities and non-adiabatic effects are extremely valuable.

Based on the singly occupied molecular orbital (SOMO) density at transition state (TS) geometries, Mayer *et al.*⁵ have proposed that FHT reactions for the benzyl/toluene ($phCH_2^\bullet/phCH_3$) and phenoxyl/phenol ($phO^\bullet/phOH$) systems occur through HAT and PCET mechanisms, respectively. For the $phCH_2^\bullet/phCH_3$ TS, the

π -type atomic orbitals of the H-donor and H-acceptor atoms are nearly parallel to the reaction coordinate, while for the $phO^\bullet/phOH$ TS, the π -type atomic orbitals of the O atoms exchanging the e^- and H^+ are orthogonal to the reaction coordinate.^{5,6} From different models DiLabio *et al.* proposed that π -lone pair and π – π stacking interactions could open additional electron transfer channels and change the mechanism from that usually expected. For example, SOMO–1 for the $phCH_2^\bullet/phCH_3$ model with π – π stacking interactions at the TS geometry could activate the PCET mechanism.⁷ However, as has been discussed by other authors, the distinction between HAT and PCET mechanisms based on molecular orbital analysis is not always conclusive and other properties should be calculated to unambiguously differentiate between HAT and PCET mechanisms.^{1,6}

Sirjoosingh and Hammes-Schiffer⁸ proposed that the evolution of atomic charges, spin densities and dipole moments as functions of the intrinsic reaction coordinate (IRC) allows quantifying fundamental differences between HAT and PCET mechanisms. For the $phCH_2^\bullet/phCH_3$ model proposed by Mayer *et al.*,⁵ the charge of the transferred nucleus through the IRC is negligible but its spin is not. Consequently, the reaction is associated with slight charge redistribution, *i.e.* the e^- and H^+ are transferred as one H^\bullet . In contrast, the nucleus transferred in the $phO^\bullet/phOH$ model



Scheme 1 Schematic representation of hydrogen atom transfer (HAT) and proton-coupled electron transfer (PCET) reactions. D and A^\bullet stand for the H-donor and H-acceptor, respectively.

^a Facultad de Química, Departamento de Física y Química Teórica,
Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico.
E-mail: jidaboy@unam.mx

^b Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San
Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa. C. P. 09340, México D. F., Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available: Optimized molecular geometries in Cartesian coordinates for transition state structures; SOMO–1 and SOMO orbitals for $C_2H_3O^\bullet/C_3H_2OH$ models (Fig. S1); evolution of the atomic charges and spin densities as functions of the IRC for $C_2H_3O^\bullet/C_3H_2OH$ models (Fig. S2); SOMO–1 and SOMO orbitals for $C_3H_5O^\bullet/C_3H_5OH$ models (Fig. S3); and evolution of the atomic charges and spin densities as functions of the IRC for $C_4H_5O^\bullet/C_4H_5OH$ model (Fig. S4). See DOI: 10.1039/c6cp08610a

proposed by Mayer *et al.*⁵ has negligible spin but a substantial positive charge and the process is associated with high charge redistribution. The charge and spin density switching between the donor and the acceptor occurs gradually for the HAT mechanism and suddenly for the PCET mechanism, features associated with the absence or presence of non-adiabatic effects through the potential energy surface (*vide infra*).⁸

Interestingly, Inagaki *et al.*⁹ proposed that in the $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$ model reaction the mechanism changes from PCET to HAT when π - π stacking interactions are present between the phenyl groups. The SOMO population in each phenolic ring has been shown to gradually change and the TS does not have non-adiabatic effects, and therefore it would correspond to a HAT mechanism.^{1,8} However, Inagaki *et al.*⁹ did not consider the spin density for the H-transferred, which is crucial to rationalize the true effects of π - π stacking interactions on concerted FHT reactions.

Skone *et al.*⁶ calculated the vibronic couplings for the $\text{phCH}_2^\bullet/\text{phCH}_3$ and $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$ models, and concluded that HAT and PCET reactions are electronically adiabatic and non-adiabatic, respectively. Tishchenko *et al.*¹⁰ found that the potential energy surfaces for the PCET reactions between phenol and the $^\bullet\text{NH}_2$ and $^\bullet\text{OOCH}_3$ radicals present topographic features associated with non-adiabatic effects, in agreement with the findings of Skone *et al.*

More recently, Harshan *et al.* calculated the vibronic coupling and adiabaticity parameter for stacked $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$ models.¹¹ Vibronic coupling indicated that formal HAT for stacked systems is electronically adiabatic but the adiabaticity parameter showed that the self-exchange reaction can be viewed as an intermediate regime between electronically adiabatic and non-adiabatic. In other words, the reaction cannot be classified as a pure HAT or PCET reaction. These results clearly indicate that further studies providing additional physicochemical insight are required to clarify whether the transferred nucleus is a H^\bullet or one H^+ and one e^- . In this context, it is also crucial to identify which kind of structure connecting reactants with products (the stacked or the non-stacked transition state) has the lowest energy; in other words, which of them is expected to contribute the most to the overall rate constant in actual systems. As discussed in ref. 11, the magnitude of the gap D_0 - D_1 (between the ground and the first excited doublet electronic state) is not necessarily conclusive for identifying one or another mechanism. This is in line with the fact that the gap is not necessarily related to how the entities are transferred.

In this work, three hydrogen exchange reactions have been studied, $\text{CH}_2\text{CHO}^\bullet/\text{CH}_2\text{CHOH}$, $\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{O}^\bullet/\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{OH}$ and $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$. For each of them, two transition states (TSs) were calculated: one including π - π stacking interactions and the other including non-stacked structures. The TS structures have been optimized using the M05-2X functional and the 6-31+G(d,p) basis set. The M05-2X functional has been specially parameterized to correctly describe non-covalent interactions as π - π stacking interactions.^{12,13} The evolution of atomic charges and spin densities as functions of the intrinsic reaction coordinate (IRC) has been studied using natural population analysis (NPA) and Hirshfeld population analysis.^{8,14} Non-adiabatic effects have been studied using the state average complete active space self-consistent field

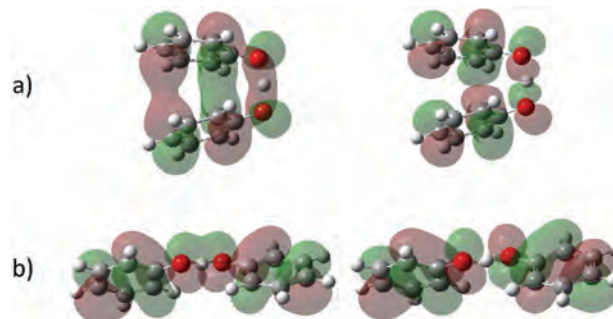


Fig. 1 SOMO-1 (left) and SOMO (right) at transition state geometries for the $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$ model systems calculated at the restricted open-shell M05-2X/6-31+G(d,p) level: (a) π - π stacking and (b) non-stacked systems.

(SA-CASSCF) method and multiconfigurational quasi-degenerate perturbation theory (MCQDPT) together with the 6-31+G(d,p) basis set.^{6,10} The SA-CASSCF method includes non-dynamical correlation and the perturbation treatment, MCQDPT, includes dynamical correlation to second order. The number of electrons (N) and the number of orbitals (M) in the active spaces (N,M) for the SA-CASSCF calculations have been selected to include the singly occupied molecular orbital (SOMO), π -type lone pairs and the molecular orbitals related to the π bonds. Therefore, the active spaces are (7,6), (11,10) and (15,14) for the $\text{CH}_2\text{CHO}^\bullet/\text{CH}_2\text{CHOH}$, $\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{O}^\bullet/\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{OH}$ and $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$ systems, respectively. Geometry optimization and population analysis were performed with the Gaussian 09 package, and multireference calculations were performed with the GAMESS electronic structure program.^{15,16}

Two features of the SOMO-1 and SOMO of the π - π stacked systems (Fig. 1, Fig. S1 and S3, ESI[†]) stand out. First, there is electron density lying on the vectors joining the oxygen atoms, which is usually associated with a HAT mechanism.^{5,6,11,17} Second, there are π - π stacking bonding interactions between π bonded C atoms, which could open an electron transfer channel and, therefore, activate the PCET mechanism for the hydrogen exchange reactions.^{7,11} This latter idea was demonstrated by the analysis of the evolution of atomic charges and spin densities for the H-acceptors, H-donors and H-transferred through the IRC (Fig. 2, Fig. S2 and S4, ESI[†]). The NPA results clearly indicate that the transferred nucleus is a proton for models with π - π

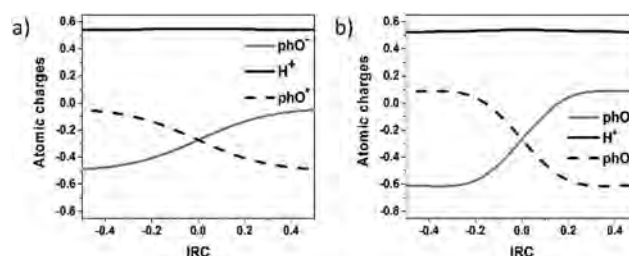


Fig. 2 NPA atomic charges and spin densities for the H-acceptor, H-transferred and H-donor as functions of the intrinsic reaction coordinate (IRC): (a) $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$ with π - π stacking interactions and (b) non-stacked $\text{phO}^\bullet/\text{phOH}$.

Table 1 NPA atomic charges, NAO occupancies and Hirshfeld spin densities for the H-transferred between the H-donor and H-acceptor in the PCET models and the $\text{phCH}_2^*/\text{phCH}_3$ model for the HAT mechanism

| | Model ^a | Charge | 1S occupancies | Spin density |
|-----------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|
| π - π stacked | A | 0.541–0.548 | 0.446–0.452 | 0.007–0.009 |
| | B | 0.541–0.549 | 0.445–0.452 | 0.004–0.007 |
| | C | 0.540–0.547 | 0.447–0.454 | 0.009–0.011 |
| Non-stacked | A | 0.528–0.547 | 0.447–0.466 | 0.005–0.008 |
| | B | 0.529–0.549 | 0.444–0.465 | 0.003–0.006 |
| | C | 0.524–0.539 | 0.454–0.470 | 0.002–0.005 |
| | HAT | 0.256–0.259 | 0.740–0.742 | 0.049–0.062 |

^a Models: A = $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^*/\text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$, B = $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^*/\text{C}_4\text{H}_5\text{OH}$, C = phO^*/phOH , HAT = $\text{phCH}_2^*/\text{phCH}_3$.

non-covalent interactions. The H charge is $\sim 0.55e^-$ for the $\text{CH}_2\text{CHO}^*/\text{CH}_2\text{CHOH}$, $\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{O}^*/\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{OH}$ and phO^*/phOH models. For non-stacked models, the atomic charge on the transferred H has the same value (Table 1 and Fig. 2, Fig. S2 and S4, ESI[†]). In addition, natural atomic orbital (NAO) occupancies of 1S orbitals indicate that the transferred H has more H^+ character than H^\bullet character (Table 1). These results are in agreement with those reported by Sirjoosingh and Hammes-Schiffer for PCET and HAT reactions.⁸ Additionally, the Hirshfeld population analysis of spin densities revealed important differences between the H-transferred in PCET models studied in this work and the HAT model $\text{phCH}_2^*/\text{phCH}_3$. In particular, the spin density on the H-transferred in the PCET models is lower than 20% of the spin density on the H-transferred in the HAT model (Table 1 and the ESI[†]).

Meanwhile, the profiles of atomic charges and spin densities for the H-donor and the H-acceptor in the π - π stacked systems (Fig. 2, Fig. S2 and S4, ESI[†]) do not present the abrupt switching usually observed for PCET reactions. This is possibly a consequence of the π - π stacking interactions, which open an early electron transfer channel because electron delocalization in this kind of system is more effective compared to conventional PCET reactions in non-stacked systems. Therefore, gradual electron transfer in this context means that π - π stacked systems, exchanging one H^\bullet atom, can react through an electronically adiabatic PCET mechanism, *i.e.* the diabatic and adiabatic H-transfer surfaces are very different (Fig. S5–S7, ESI[†]). During such a process, the e^- and H^+ are transferred as independent entities but the e^- is effectively delocalized along the whole reaction pathway, *i.e.* the e^- is transferred between the π delocalized moieties and the H^+ is transferred between the H-donor and H-acceptor oxygen atoms. This analysis is in agreement with the fact that the proton tunneling and electronic transition times, τ_p and τ_e , respectively, are similar for all stacked systems, *i.e.* the adiabaticity parameter, $p = \tau_p/\tau_e$, is ~ 1 (Table S1, ESI[†]).¹¹

The gap between the ground state (D_0) and the first excited state (D_1) is another quantitative criterion to determine the existence of non-adiabatic effects. They were calculated using the SA-CASSCF and MCQDPT correlated methods, and are reported in Table 2. For the $\text{CH}_2\text{CHO}^*/\text{CH}_2\text{CHOH}$ and $\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{O}^*/\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{OH}$ models with π - π stacking interactions, the gaps between D_0 and D_1 states at the MCQDPT (SA-CASSCF) level are 38.76 (41.25) kcal mol⁻¹ and 30.16 (32.17) kcal mol⁻¹, respectively.

Table 2 Active space (N,M) and energy gap (ΔE , kcal mol⁻¹) between the ground doublet electronic state (D_0) and the first doublet excited state (D_1) at the transition state (TS) geometry for the PCET models with and without π - π stacking interactions

| | Model ^a | (N,M) ^b | ΔE_{CASSCF} ^c | ΔE_{MCQDPT} ^c |
|-----------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| π - π stacked | A | (7,6) | 41.25 | 38.76 |
| | B | (11,10) | 32.17 | 30.16 |
| | C | (15,14) | 32.49 | 24.11 |
| Non-stacked | A | (7,6) | 7.59 | 7.27 |
| | B | (11,10) | 4.99 | 4.97 |
| | C | (15,14) | 6.78 | 6.92 |

^a Models: A = $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^*/\text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$, B = $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^*/\text{C}_4\text{H}_5\text{OH}$, C = phO^*/phOH . ^b N and M indicate the number of active e^- and active orbitals. ^c $\Delta E = E_{D_1} - E_{D_0}$ calculated using the method indicated by the subscript.

For the phO^*/phOH system with π - π stacking interactions, the gap is 24.11 (32.49) kcal mol⁻¹. In contrast, the gaps for the systems without π - π stacking interactions are 7.31 (7.40) kcal mol⁻¹ for the $\text{CH}_2\text{CHO}^*/\text{CH}_2\text{CHOH}$ model, 4.97 (4.99) kcal mol⁻¹ for the $\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{O}^*/\text{CH}_2(\text{CH})_3\text{OH}$ model and 6.92 (6.78) kcal mol⁻¹ for the phO^*/phOH system. These values of the energy gaps can be related to the existence of non-adiabatic effects at TS geometries. The results are in concordance with those presented in ref. 11, albeit the interpretation is somehow different.

In addition, the reactions involving π - π stacked systems do not fulfill the expected requirement for the PCET mechanism to be considered diabatic. This is shown by the nonadiabatic coupling calculations performed by Harshan *et al.*¹¹ and the adiabaticity parameters calculated in this work (Table S1, ESI[†]).

The relative stabilities of the π - π stacked structures with respect to the non-stacked structures, calculated from D_0 state energies, are presented in Table 3. The data include the results for the CCSD(T)/6-311++G(d,p) level. At the SA-CASSCF/6-31+G(d,p) level, the π - π stacked TS for the $\text{CH}_2\text{CHO}^*/\text{CH}_2\text{CHOH}$ model is the only system favored with respect to the non-stacked structures. In contrast, at the MCQDPT/6-31+G(d,p) and CCSD(T)/6-311++G(2d,p) levels, all the π - π stacked structures are energetically favored with respect to the non-stacked systems. The latter results are very important because they demonstrate that the π - π stacked structures are more stable compared to the non-stacked structures.

The reaction barrier is another important feature that is dramatically different between PCET and HAT. When using the classical examples of PCET and HAT, *i.e.* phO^*/phOH and

Table 3 Relative stability of the D_0 state (ΔE_{D_0} , kcal mol⁻¹) for the model systems with π - π stacking interactions with respect to the systems without π - π stacking interactions using three calculation methods

| Model ^a | ΔE_{D_0} ^b | | |
|--------------------|-------------------------------|--------|----------------------|
| | SA-CASSCF | MCQDPT | CCSD(T) ^c |
| A | -1.77 | -1.36 | -5.51 |
| B | 0.28 | -4.91 | -5.74 |
| C | 2.00 | -2.78 | -5.80 |

^a Models: A = $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^*/\text{C}_2\text{H}_3\text{OH}$, B = $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^*/\text{C}_4\text{H}_5\text{OH}$, C = phO^*/phOH . ^b $\Delta E_{D_0} = E_{D_0}(\text{stacked}) - E_{D_0}(\text{non-stacked})$. ^c 6-311++G(2d,p) basis set has been used.

Table 4 Gibbs free energy of activation (ΔG^\ddagger , kcal mol⁻¹) for the hydrogen exchange reaction for proton coupled electron transfer (PCET) and hydrogen atom transfer (HAT) mechanisms

| Mechanism | Model ^a | ΔG^\ddagger | |
|-----------|--------------------|-----------------------|-------------|
| | | π - π stacked | Non-stacked |
| PCET | A | 14.08 | 16.24 |
| | B | 13.25 | 13.85 |
| | C | 10.65 | 11.27 |
| HAT | D | 27.93 | 27.68 |
| | E | 30.71 | 30.85 |
| | F | 24.44 | 24.16 |

^a Models: A = C₂H₃O[•]/C₂H₃OH, B = C₄H₅O[•]/C₄H₅OH, C = phO[•]/phO, D = C₃H₅O[•]/C₃H₆, E = C₅H₇O[•]/C₅H₈, F = C₇H₉O[•]/C₇H₁₀.

phCH₂[•]/phCH₃, the difference is found to be dramatic. At the M05-2X/6-31+G(d,p) level of calculation, the barriers corresponding to the non-stacked transition states are 11.3 and 24.2 kcal mol⁻¹ for PCET and HAT, respectively, while the bond dissociation Gibbs energies of both breaking (forming) bonds are very close (81.24 kcal mol⁻¹ for phO[•]/phOH and 82.68 kcal mol⁻¹ for phCH₂[•]/phCH₃).

The barriers for some hydrogen atom exchange reactions are shown in Table 4. Most of them are unambiguously classified as HAT or PCET. In such cases, the dependence of the barrier height on the reaction mechanism is obvious, *i.e.* all PCET reactions have lower activation barriers compared to HAT reactions. On the other hand, when comparing both transition states for the same reaction (stacked and non-stacked) the differences in the barriers are only moderate.

Conclusions

The results obtained in this work for model systems with and without π - π stacking interactions allow reinterpretation of the character of the transferred entities (H⁺, e⁻ vs. H[•]). It is proposed that in both cases the H corresponds to a H⁺; thus the π - π stacking interactions do not change the PCET mechanism. Instead, such interactions allow the e⁻ to instantly respond to the H⁺ motion (adiabatic transfer), with the charges and spin densities gradually changing as the reaction proceeds. In such a process the e⁻ is transferred between the π delocalized moieties, while the H⁺ is transferred between the H-donor and H-acceptor oxygen atoms.

In addition, comparison of barrier heights for different PCET and HAT models showed that PCET barriers are systematically much lower than HAT barriers. This could be another important criterion for differentiating between both reaction mechanisms. The gathered data strongly suggest that analysing different criteria is required to unequivocally differentiate

between these two mechanisms for a given chemical system. Relative stabilities for the ground state energy surfaces indicated that π - π stacked systems are energetically favoured, compared to non-stacked systems. Thus, they are expected to be the ones involved in the dominant reaction mechanism.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGTIC) at Universidad Nacional Autónoma de México. This work was partially supported by a grant from the DGAPA UNAM PAPIIT-IN220215. L. M.-R. thanks CONACyT for scholarship 270309.

References

- 1 S. Hammes-Schiffer, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 7696–7703.
- 2 A. Migliore, N. F. Polizzi, M. J. Therien and D. N. Beratan, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 3381–3465.
- 3 J.-M. Savéant, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2014, **7**, 537–560.
- 4 J. J. Warren, T. A. Tronic and J. M. Mayer, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 6961–7001.
- 5 J. M. Mayer, D. A. Hrovat, J. L. Thomas and W. T. Borden, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **114**, 11142–11147.
- 6 J. H. Skone, A. V. Soudackov and S. Hammes-Schiffer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16655–16663.
- 7 G. A. DiLabio and E. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 6199–6203.
- 8 A. Sirjoosingh and S. Hammes-Schiffer, *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 2367–2377.
- 9 T. Inagaki, T. Yamamoto and S. Kato, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 3081–3091.
- 10 O. Tishchenko, D. G. Truhlar, A. Ceulemans and M. T. Nguyen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 7000–7010.
- 11 A. K. Harshan, T. Yu, A. V. Soudackov and S. Hammes-Schiffer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 13545–13555.
- 12 Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, **2**, 364–382.
- 13 Y. Zhao and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2007, **3**, 289–300.
- 14 L. Muñoz-Rugeles and J. R. Alvarez-Idaboy, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 28525–28528.
- 15 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, *et al.*, *Gaussian 09, Revision D01*, 2009.
- 16 M. W. Schmidt, K. K. Baldridge, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis and J. A. Montgomery, *J. Comput. Chem.*, 1993, **14**, 1347–1363.
- 17 C. D'Alfonso, M. Bietti, G. A. DiLabio, O. Lanzalunga and M. Salamone, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 1026–1037.



A proton–electron sequential transfer mechanism: theoretical evidence about its biological relevance†

L. Muñoz-Rugeles and J. R. Alvarez-Idaboy*

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 28525Received 26th August 2015,
Accepted 2nd October 2015

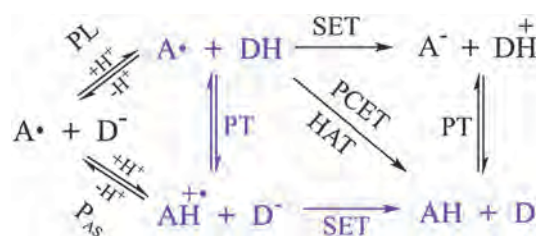
DOI: 10.1039/c5cp05090a

www.rsc.org/pccp

Density functional theory calculations, using the SMD continuum model, indicate that hydrogen transfer from totally protonated uric to a tryptophanyl radical in proteins corresponds to a sequential mechanism. Modeling in methyl butanoate indicates that this mechanism is more important in a hydrophobic medium than in water.

Recent studies have shown that damage caused by radicals to tryptophan and tyrosine residues in proteins can be efficiently repaired by uric (H_3Ur) and ascorbic acids (H_2Asc) at physiological pH.^{1,2} However, neither the repair reaction mechanism nor the participating species have been identified. Even though no experimental or theoretical evidence is available, the repair activity has usually been assumed to be performed by the main fractions of uric and ascorbic acids *i.e.* the urate (H_2Ur^-) and ascorbate (HAsc^-) anions.³ Reaction between the damaged protein radical (A^\bullet) and the repairer antioxidant (DH) (in this case, the tryptophanyl radical, TrpN^\bullet , and the H_3Ur acid, respectively) could, in principle, occur either in one reaction step or in multiple steps. The favored mechanism would depend on the intrinsic and environmental features of the reactants. The possible reaction mechanisms are shown in Scheme 1. As can be seen there are several possibilities, in blue the one we are studying in the present work.

In PCET reactions, one proton and one electron are transferred as separated particles between different sets of orbitals, and the process is associated with significant molecular charge redistribution.^{4–6} The contributions to the electron density of the HOMO and SOMO orbitals come essentially from atomic



Scheme 1 Repair reaction mechanisms.

orbitals involved in the single electron transfer (SET), rather than from the ones involved in the proton transfer (PT). For example, in the phenoxyl radical–phenol classical PCET model ($\text{PhO}^\bullet\text{–PhOH}$), the electron density on the acceptor and donor oxygen atoms in the transition state involves $2p\text{--}\pi$ atomic orbitals which are nearly perpendicular to the reaction coordinate (Fig. S1 in the ESI†). Then, PT occurs between the oxygen σ -orbitals while SET occurs *via* the channel provided by the oxygen–oxygen π -orbital interactions present in the HOMO orbital.^{4,5}

If one proton and one electron are transferred in separate steps, the reaction mechanism is sequential. Sequential proton-loss electron transfer (SPLET) is an important reaction mechanism for phenolic compounds with free radicals.⁷ In an SPLET reaction, one proton is first lost by DH in the proton loss (PL) step, thus generating the D^- anion, which is a better electron donor than DH . The second step is a SET reaction and the products are the D^\bullet radical and the A^- anion. However, if the electron affinity of A^\bullet is small, it could capture a proton from the solvent before the SET step occurs (protonation assisted by solvent, P_{As}) and form the $\text{AH}^{\bullet+}$ radical cation, which is a better electron acceptor than A^\bullet . This variant of SPLET is denoted as $\text{SP}_{\text{As}}\text{ET}$.

Another possibility for hydrogen transfer sequential reactions is that both PT and SET occur directly between reactants. If the SET step between A^\bullet and DH occurs before the PT step, the mechanism could be called electron–proton sequential transfer (EPST). On the contrary, if the SET step between A^\bullet and DH occurs after the PT step, the mechanism would be called proton–electron sequential transfer (PEST). In either PEST or EPST,

Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 044510, Mexico.
E-mail: jidaboy@unam.mx

† Electronic supplementary information (ESI) available: Details on computational methodology. Transition state structures and their HOMO and SOMO orbitals for the HAT and PCET models (Fig. 1). Hirshfeld atomic charges and spin density variation as a function of the reaction coordinate for the HAT and PCET models (Fig. S2). The intrinsic reaction coordinates for PEST transition states (Fig. S3). Distribution diagrams at pH = 7.4 for the ascorbic and uric acids (Fig. S4). Table S1. Single electron transfer thermodynamics data calculated from Marcus theory. Cartesian coordinates of main stationary points. See DOI: 10.1039/c5cp05090a

Table 1 Reaction free energies (ΔG_{rxn}^\ddagger , kcal mol⁻¹), activation free energies (ΔG^\ddagger , kcal mol⁻¹) and rate constants (k , M⁻¹s⁻¹) for reaction steps of a PEST mechanism with uric (H₃Ur) and (H₂Asc) ascorbic acids in water. These free energies of reaction have been calculated using experimental values of pK_a.^b The k values have not been corrected for molar fractions of reagents at pH 7.4.

| Reaction step | Repairer | ΔG_{rxn}^\ddagger | ΔG^\ddagger | k^b |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------|
| PT | H ₃ Ur | 1.50 ^a | 2.11 | 7.39 × 10 ⁹ |
| | H ₂ Asc | -0.68 ^a | 0.00 | 6.66 × 10 ⁹ |
| SFT | H ₂ Ur ⁻ | -6.18 | 0.97 | 7.43 × 10 ⁹ |
| | H ₂ Asc ⁻ | -10.98 | 0.15 | 7.42 × 10 ⁹ |

The activation free energy (ΔG^\ddagger) for PT between TrpN[•] and H₃Ur is 2.11 kcal mol⁻¹; for TrpN[•] and H₂Asc it occurs without a barrier. Therefore the PT reaction rate (k_{PT}) is diffusion controlled for both systems, *i.e.* $k_{PT} \sim 10^9$ M⁻¹s⁻¹ (Table 1). However, k_{PT} values, corrected for molar fractions of reagents at pH 7.4, are 1.77×10^8 and 2.09×10^6 M⁻¹s⁻¹ for repair reactions with H₃Ur and H₂Asc, respectively. Information about the calculation of corrected rate constants can be found in the ESI.[†] The ΔG^\ddagger values for SFT between a Trp^{•+} radical cation and the H₂Ur⁻ and H₂Asc⁻ monoanions are 0.97 and 1.47 kcal mol⁻¹, respectively, considering the reaction from isolated reactants to isolated products. Therefore, after the PT step, the SFT rate constants (k_{SFT}) are diffusion controlled for both systems (Table 1).

The transition states of the studied repair reactions and their HOMO and SOMO electronic densities are shown in Fig. 1. The SOMO density is completely localized over the TrpN[•] radical, while the HOMO density involves only the repairers. According to the above discussion, this clearly indicates that PT and SFT occur in separate steps, as expected for a PEST mechanism of hydrogen transfer. The contribution percentage from the repairer–TrpN[•] pairs to the HOMO and SOMO orbitals of the transition states are 100–0% and 0–100%, respectively, for both systems. For the classical HAT and PCET reactions mentioned above, the contribution percentage to the SOMO and HOMO are 50–50% (Fig. S1, ESI[†]).

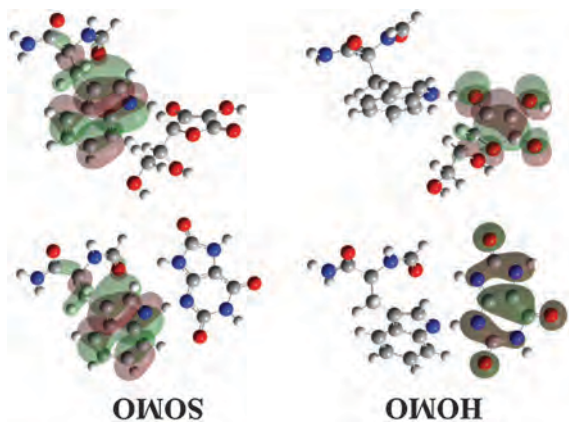


Fig. 1 Transition states and their HOMO and SOMO orbitals for repair reactions of the tryptophanyl radical with uric acid, H₃Ur–TrpN[•] (top) and ascorbic acid, H₂Asc–TrpN[•] (bottom).

the electronic density of the HOMO and SOMO orbitals remains almost invariant through the PT step.

In this work, we have studied the repairing reactions of TrpN[•] by H₃Ur and H₂Asc acids using density functional theory. Results indicate that, at pH 7.4, these reactions occur *via* a PEST mechanism for H₃Ur, and *via* an SP^{AS}FT for H₂Asc. Moreover, in a nonpolar medium (*i.e.* low dielectric constant), PEST is shown to be the only important repair mechanism.

Geometry optimizations and frequency calculations have been carried out using the M05-2X functional⁸ and the 6-31+G(d,p) basis set, in conjunction with the SMD continuum model,⁹ using water and methyl butanoate as solvents. Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies. The rate constants (k) were calculated using conventional transition state theory (TST)^{10–12} and the 1 M standard state. For the single electron transfer (SET) reactions ΔG^\ddagger was calculated using Marcus theory.^{13,14} The orbitals were obtained for the optimized TS structures using restricted open-shell M05-2X with the 6-31+G(d,p) basis set.⁵ Quantitative measures of the selected lone pair- π and π - π interactions in these orbitals were calculated using the overlap expressions from Mulliken.^{5,15} The data for the analysis of the atomic charges of the H-donor, the H-acceptor, and the transferring H atoms, as a function of the reaction coordinate,⁶ were obtained using the points on the ground state reaction path (generated from intrinsic reaction coordinate calculations, IRC) and the Hirsfeld partition scheme. More detailed information about the methodology used in the calculations can be found in the ESI.[†]

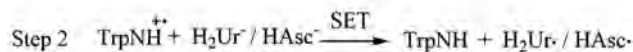
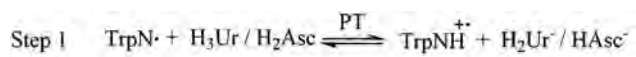
The reaction free energies (ΔG_{rxn}^\ddagger), relative to isolated reactants, for a SFT from H₃Ur and H₂Asc to TrpN[•] are found to be large and positive: 34.55 and 41.28 kcal mol⁻¹, respectively. It implies that these completely protonated acids are poor electron donors, and that the first step of EPST does not occur. Moreover, SPLET does not occur either because TrpN[•] does not accept electrons even from good electron donors such as H₂Ur⁻ and H₂Asc⁻. The corresponding ΔG_{rxn}^\ddagger values are 17.86 and 13.05 kcal mol⁻¹, respectively. Therefore, TrpN[•] is clearly a poor electron acceptor. Thermodynamic data calculated from Marcus theory are included in Table S1, in the ESI.[†] The pK_a values for the tryptophanyl radical cation (Trp^{•+}) and for the H₃Ur and H₂Asc acids are close to each other (4.7, 5.8 and 4.2, respectively). Therefore, a PT from the protonated acids to TrpN[•] can be expected to occur, thus supporting the existence of a PEST repair mechanism. The ΔG_{rxn}^\ddagger values for PT from the acids to TrpN[•], calculated using experimental values of pK_a, are 1.50 and -0.68 kcal mol⁻¹ for H₃Ur and H₂Asc, respectively (Table 1). Even though the proton transfer between TrpN[•] and H₃Ur is endergonic, relative to the isolated reagents, Marcus theory predicts that SFT occurs rapidly if the charge separation increases in both systems during the PT reaction.¹⁶ In this case, when the TrpN[•] radical is protonated to form the Trp^{•+} radical cation, its electron affinity increases and the ΔG_{rxn}^\ddagger values for SFT from H₂Ur⁻ and H₂Asc⁻ are -6.18 and -10.98 kcal mol⁻¹, respectively (Table 1). The theoretical ΔG_{rxn}^\ddagger values for PT from the acids to TrpN[•] are 1.37 kcal mol⁻¹ for H₃Ur and 1.29 kcal mol⁻¹ for H₂Asc. The theoretical value for H₃Ur acid is in excellent agreement with the experimental value while it is acceptable for H₂Ac acid.

In order to evaluate the competition between PEST and $SP_{AS}ET$ in the reaction between the $Trp^{\bullet+}$ radical cation and the anionic acids, the rate constants for the PT step in PEST should be compared with the SET rate constants (Table 1), since in the $SP_{AS}ET$ mechanism P_{AS} is considered a diffusion controlled step. $SP_{AS}ET$ rate constants at pH 7.4 are 1.39×10^7 and $1.43 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for repair reactions with H_2Ur^- and $HAsc^-$, respectively (ESI[†]). These results indicate that, for H_3Ur acid, the PEST mechanism is more important than $SP_{AS}ET$: $k_{PEST} > k_{SP_{AS}ET}$. On the other hand, for H_2Asc , $SP_{AS}ET$ is more important than PEST, and the latter mechanism is not competitive in water, *i.e.* $k_{SP_{AS}ET} > k_{PEST}$. It is extremely important to note that there is no competition between PEST and $SP_{AS}ET$ in a lipid medium because the only species present in lipid medium are the completely protonated fractions, H_3Ur and H_2Asc .

Based on the above discussion we propose a proton–electron sequential transfer mechanism, PEST, for the repair reaction in water and lipid medium of the $TrpN^{\bullet}$ radical with the H_3Ur and H_2Asc acids. The reactions are shown in Scheme 2. The final products are the repaired Trp and the H_2Ur^{\bullet} and $HAsc^{\bullet}$ radicals. To our knowledge, this is the first example of a PEST reaction.

An analysis of atomic charges and spin densities as a function of the reaction coordinate for the H-donor, the H-acceptor and the transferred H atom has been used to differentiate between PCET and HAT.⁶ Thus, in this work these descriptors have been used successfully to unambiguously demonstrate that calculated transition states correspond to PT transition states and that the repair reactions occur through a PEST mechanism (Fig. 2).

In the HAT model, the Hirshfeld atomic charges and spin densities of the transferred hydrogen atom are 0.02–0.04 and 0.038–0.062, respectively (Fig. S2, ESI[†]). For the PCET and PEST mechanisms, the proton transfer and the electron transfer occur as separated particles, then the atomic charge and the spin density on the transferred hydrogen must be equal to that of the proton for both mechanisms. In the PCET model, the Hirshfeld atomic charges and spin densities on the transferred hydrogen atom are 0.10–0.11 and 0.002–0.005, respectively (Fig. S2, ESI[†]). In comparison, the corresponding values for the transferring hydrogen in the PEST systems are 0.11–0.12 and 0.004–0.007 for the reaction of $TrpN^{\bullet}$ with H_3Ur , and 0.11–0.12 and 0.004–0.005 for the reaction of $TrpN^{\bullet}$ with H_2Asc , Fig. 2. Therefore, the proton is transferred in the first step of the PEST mechanism, *i.e.* the charges on the transferred hydrogen in the PCET model correspond to the charge of a proton, and consequently the charges in the PEST model correspond to charges of a proton too. In the HAT mechanism the atomic charges are approximately one order of magnitude smaller, while spin densities are approximately one order of magnitude larger compared to PCET and PEST mechanisms.



Scheme 2 Steps for PEST repair mechanism.

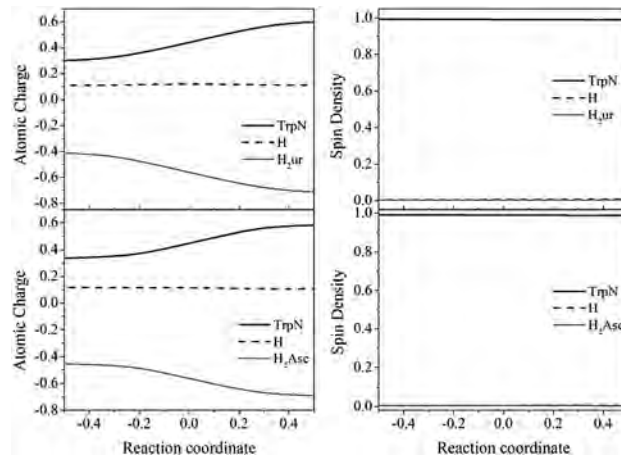


Fig. 2 Hirshfeld atomic charges and spin density variation as a function of the reaction coordinate for the hydrogen atom transfer reaction for the proton–electron sequential transfer reaction (PEST) of the tryptophanyl radical with uric acid, $TrpN-H_3Ur$ (top), and ascorbic acid, $TrpN-H_2Asc$ (bottom).

It has been shown that in a PCET mechanism, the atomic charges and spin densities of the H-acceptor and the H-donor switch signs.⁶ In a PEST mechanism, the charge on the H-acceptor becomes more positive and the charge on the H-donor becomes more negative, while the spin densities for the H-acceptor and the H-donor are constant. In the case of $TrpN^{\bullet}$ with the H_2Asc and H_3Ur acid reactions, the observed changes in the charges and spin densities are consistent with a PT step.

Similarly to the analysis of atomic charges and spin densities used to differentiate between PCET and HAT, the evolution of the Hirshfeld dipole moment vector has been used successfully too.⁶ For the PCET model, an inversion of the dipole moment component on the reaction coordinate is observed in the course of the reaction (Fig. 3). This behavior of the dipole moment vector is also observed in the case of the $PhCH_2-PhCH_3$ HAT model; however, the change in the dipole moment magnitude is significantly larger for the PCET reaction, *i.e.* the range variation is from 0.15 to -0.15 for HAT and it varies from 2.38 to -2.38 for PCET (Fig. 3). The switching of the signs indicates a change in the electronic charge distribution for the HAT and PCET mechanisms because the proton is transferred simultaneously with the electron. On the other hand, in a PEST mechanism, the dipole moment increases and the switching of the signs does not occur, *i.e.* the charge separation increases (Fig. 3).

In order to assess the solvent effects present in a PEST mechanism, we analyzed the energy profile of the repair reaction with H_3Ur in methyl butanoate, and compared it with the energy profile in water (Fig. 4). The potential energy surfaces (PESs), in terms of free energy (ΔG) and enthalpy (ΔH) changes, were calculated considering the formation of product complexes for the PT and ET steps of the PEST mechanisms (denoted as PTC and ETC, respectively). The PTCs are metastable species, and ETC corresponds to the final product complexes, *i.e.* the repaired Trp and a H_2Ur^{\bullet} radical. The isolated reactants and products are indicated as R and P, respectively.

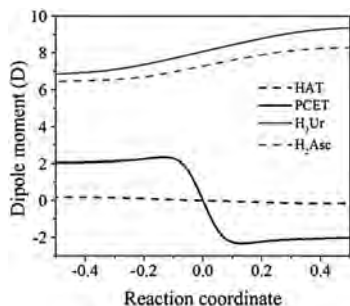


Fig. 3 Evolution of the Hirshfeld dipole moment vectors for the hydrogen atom transfer reaction (HAT) between the benzyl radical and toluene, $\text{PhCH}_2\text{-PhCH}_2$; the proton-coupled electron transfer (PCET) between the phenoxyl radical and phenol, PhO-PhOH ; and the proton-electron sequential transfer (PEST) of the tryptophanyl radical with H_3Ur and H_2Asc . The dipolar moment vectors have been projected over the vector joining the donor and acceptor atoms.

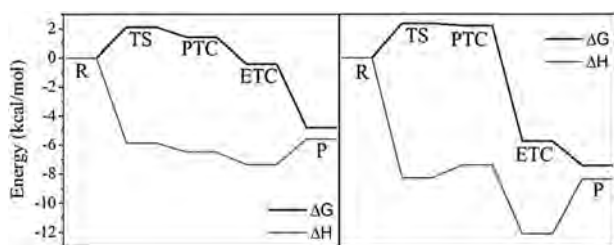


Fig. 4 Potential energy surfaces in free energy and enthalpy, ΔG and ΔH , respectively, for reaction of a tryptophanyl radical and uric acid in water (left) and methyl butanoate (right). Reactants, transition states, proton transfer complexes, electron transfer complexes and products are identified like R, TS, PTC, ETC and P, respectively.

For methyl butanoate ΔG^\ddagger is $2.37 \text{ kcal mol}^{-1}$, which is $0.26 \text{ kcal mol}^{-1}$ higher compared to ΔG^\ddagger for the corresponding reaction in water. Therefore, the PT rate constant remains diffusion-controlled in lipid medium. Furthermore, the formation of a SET complex is more exergonic in methyl butanoate compared to the one observed in the reaction in water. Thus the total process is more irreversible in methyl butanoate than in water. Both systems have similar behavior in terms of ΔG and ΔH . After the activation barrier is overcome, the ΔG values drop in the direction of the isolated products and the total process of repairing is essentially irreversible. On the other hand, the formation of the transition state is significantly favored by the ΔH factor, while the formation of PT complexes in water is favored by both entropy (ΔS) and ΔH , and the formation in methyl butanoate is favored by ΔS . The formation of SET complexes is favored by ΔS and ΔH in both solvents. Finally, the dissociation of the SET complex to form the final products is disfavored by ΔH , because it involves the breaking of a hydrogen bond. The similar behavior in both solvents shows that the PEST mechanism is slightly dependent on the solvent and therefore almost any solvent model may be appropriate. Consequently, it is safe to assume that no explicit solvent molecules are needed.

Conclusions

These results represent a step towards a deeper understanding of the protective and reparative repairing activity of antioxidant

compounds that are present in high concentrations in living organisms. Moreover, due to the absence of mechanisms of enzymatic repair for damage caused by free radicals to Trp residues, the mechanism studied here becomes even more important. To date, the antioxidant activity of H_3Ur and H_2Asc acids has been ascribed solely to the anions obtained in the first deprotonation at physiological pH. However, our results indicate that the repair activity of the completely protonated fractions is not negligible, and it must be considered in the interpretation of experimental studies. Modeling in methyl butanoate indicates that the PEST mechanism is more important in a hydrophobic medium than in water, since the only fractions present in lipid medium are the completely protonated acids and, therefore, PEST is likely the only reaction mechanism. To the best of our knowledge this is the first case of a reaction that has been shown to occur *via* a proton-electron sequential transfer mechanism.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGTIC) at Universidad Nacional Autónoma de México. This work was partially supported by a grant from the DGAPA UNAM (PAPIIT-IN209812), and the Project SEP-CONACyT 167430. L.M.-R. thanks CONACyT for scholarship 270309.

References

- 1 A. S. Domazou, W. H. Koppenol and J. M. Gebicki, *Free Radical Biol. Med.*, 2009, **46**, 1049–1057.
- 2 A. S. Domazou, H. Zhu and W. H. Koppenol, *Free Radical Biol. Med.*, 2012, **52**, 1929–1936.
- 3 A. S. Domazou, J. M. Gebicki, T. Nauser and W. H. Koppenol, *Isr. J. Chem.*, 2014, **54**, 254–264.
- 4 J. M. Mayer, D. A. Hrovat, J. L. Thomas and W. T. Borden, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 11142–11147.
- 5 G. A. Dilabio and E. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 6199–6203.
- 6 A. Sirjoosingh and S. Hammes-Schiffer, *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 2367–2377.
- 7 G. Litwinienko and K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 222–230.
- 8 Y. Zhao, N. E. Schultz and D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.*, 2006, **2**, 364–382.
- 9 A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 6378–6396.
- 10 H. Eyring, *J. Chem. Phys.*, 1935, **3**, 107.
- 11 M. G. Evans and M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.*, 1935, **31**, 875.
- 12 D. G. Truhlar, W. L. Hase and J. T. Hynes, *J. Phys. Chem.*, 1983, **87**, 2664–2682.
- 13 R. Marcus, *Rev. Mod. Phys.*, 1993, **65**, 599–610.
- 14 R. A. Marcus, *Pure Appl. Chem.*, 1997, **69**, 13–30.
- 15 R. S. Mulliken, *J. Chem. Phys.*, 1955, **23**, 1833.
- 16 A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy, *J. Comput. Chem.*, 2013, **34**, 2430–2445.