



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO TEÓRICO DE MECANISMOS DE REACCIÓN Y CINÉTICA DE
ANTIOXIDANTES SULFURADOS FRENTE A RADICALES OXIGENADOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. C. ROMINA CASTAÑEDA ARRIAGA

TUTOR

Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy. Facultad de Química, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Fernando Cortés Guzmán. Instituto de Química, UNAM.

Dr. Jesús Hernández Trujillo. Facultad de Química, UNAM.

MÉXICO, D. F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. José Pedraza Chaverri
VOCAL	Dr. Francisco Miguel Castro Martínez
VOCAL	Dra. Silvia Cristina Iuga
VOCAL	Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
SECRETARIO	Dr. Fernando Cortés Guzmán

Asesor

Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy

Sustentante

M. C. Romina Castañeda Arriaga

Este trabajo se realizó en:

- Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Department of Chemistry, Faculty of Science, Thompson Rivers University.

Se presentó en los siguientes congresos:

- XIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. 2014. Morelia, Michoacán.
- XI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. 2012. Toluca, Estado de México.
- X Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. 2011. Pachuca, Hidalgo.

De este trabajo se desprende la publicación:

Castañeda-Arriaga, R., Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Chem. Inf. Model.* Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. A Comprehensive Theoretical Study of Their Antioxidant Activity Supported by Available Experimental Kinetic Data. **2014**, *54*, 1642–1652.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy por su incondicional apoyo durante toda mi carrera profesional, sus enseñanzas, su apoyo y su amistad.

Al Dr. Fernando Cortés Guzmán y al Dr. Jesús Hernández Trujillo por formar parte de mi Comité Tutelar, apoyarme y orientarme durante mi estancia doctoral.

A la Dra. Nelaine Mora Diez por su apoyo y cordial recibimiento durante mi estancia en la Universidad Thompson Rivers, BC, Canadá.

A CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado, número de becario: 227093.

A los miembros de mi jurado, por la revisión de esta tesis y sus valiosas contribuciones para mejorarla.

A la Coordinación de Supercómputo. DGTIC-UNAM.

CONTENIDO

Resumen.	7
1. Introducción.	9
2. Marco Teórico.	11
2.1 Funcional M06-2x.	11
2.2 Funciones de base.	11
2.3 Modelos de solvente continuo.	12
2.3.1 Modelo de solvatación universal (SMD).	12
2.4 Transferencia electrónica. Teoría de Marcus.	13
2.5 Reacciones controladas por difusión.	15
3. Antecedentes.	19
3.1 Estrés oxidativo.	19
3.2 Antioxidantes sulfurados.	19
3.2.1 Estudios celulares e in vivo con antioxidantes sulfurados.	21
3.2.2 Capacidad antioxidante primaria. Atrapadores de radicales libres.	23
3.2.3 Capacidad antioxidante secundaria. Formación de complejos de coordinación.	25
3.3 Reparación de biomoléculas con antioxidantes.	25
3.4 Estudios teóricos con antioxidantes sulfurados.	26
4. Objetivos.	28
5. Metodología Computacional.	29
6. Discusión de Resultados.	33
6.1 Atrapadores de radicales.	33
6.1.1 Ácido lipoico y ácido dihidrolipoico.	34
Geometría.	35
Estudio termodinámico.	48
Estudio cinético.	51
6.1.2 Cisteína.	70
Geometría.	70
Estudio termodinámico.	73
Estudio cinético.	74
6.1.3 Tiopronina.	79
Geometría.	79
Estudio termodinámico.	83
Estudio cinético.	84
6.1.4 Comparaciones.	89
6.2 Formación de Complejos con Cobre. Reacción de ciclo de Haber–Weiss.	92

6.3 Reparación de Proteínas con Dihidrolipoato.	102
Geometría.	102
Estudio termodinámico.	104
Estudio cinético.	104
7. Conclusiones.	108
8. Apéndice.	110
9. Referencias bibliográficas.	114
Artículo publicado	119

RESUMEN

Diversos radicales libres son producidos de forma natural en los organismos vivos. Además, éstos también pueden estar en contacto con los radicales libres de forma externa. Cuando la producción de radicales libres supera la capacidad de los organismos para eliminarlos, se genera estrés oxidativo, lo cual puede resultar en enfermedades o incluso en la muerte. Enfermedades como accidentes cardio-vasculares, determinados tipos de cáncer, envejecimiento precoz, arterosclerosis y el desarrollo del mal de Alzheimer han sido relacionados con procesos de estrés oxidativo.

Los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, pueden ayudar a mantener en equilibrio a los radicales libres dentro del organismo. A través de diversas investigaciones, se ha demostrado que varios compuestos sulfurados, como el glutatión, son excelentes antioxidantes. Sin embargo, la mayoría de estos estudios, por su complejidad, no han dado detalle de los mecanismos por los que estos antioxidantes reaccionan con los agentes oxidantes. En la química computacional podemos encontrar herramientas que nos ayuden a estudiar los sistemas antioxidante-radical libre con mayor detalle.

Este trabajo consistió en el estudio teórico de la actividad antioxidante de cuatro compuestos sulfurados frente a radicales libres oxigenados: ácido lipoico, ácido dihidrolipoico, cisteína y tiopronina. El estudio fue hecho considerando las especies existentes bajo condiciones fisiológicas, es decir, a $\text{pH}=7.4$.

En la primera etapa de este estudio se analizó la actividad antioxidante primaria de los cuatro compuestos mencionados. Dentro de ésta se estudiaron los mecanismos de abstracción de hidrógeno y transferencia electrónica. La segunda fase consistió en determinar la capacidad antioxidante secundaria del ácido lipoico y del ácido dihidrolipoico, es decir, de qué manera estos compuestos forman complejos de coordinación con el cobre, los cuales, ayudan a evitar que se formen radicales hidroxilo a través del ciclo de Haber-Weiss. Mediante la tercera etapa se probó la forma en que el ácido dihidrolipoico repara proteínas.

Los resultados obtenidos revelan la gran capacidad antioxidante de estos compuestos sulfurados frente a diversos radicales libres oxigenados. El ácido dihidrolipoico, la cisteína zwitteriónica y la tiopronina aniónica, los cuales tienen al menos un grupo tiol, reaccionan preferentemente por abstracción de hidrógeno de este grupo con radicales libres de diferente reactividad. La cisteína aniónica y la tiopronina dianiónica, aunque se encuentran en menor porcentaje a $\text{pH} 7.4$ que sus respectivos compuestos protonados, reaccionan por transferencia electrónica con constantes de velocidad controladas por difusión. Se demostró que el ácido dihidrolipoico, además de ser un excelente atrapador de radicales libres, también es un buen agente quelante de cobre y reparador del daño a proteínas por radicales libres.

ABSTRACT

Various free radicals are produced naturally in living organisms. Moreover, they may also be in contact with free radicals externally. When the production of free radicals exceeds the capacity of organisms to eliminate that radicals, oxidative stress is generated, which can result in illness or death. Diseases such as cardio-vascular accidents, certain cancers, premature aging, atherosclerosis and the development of Alzheimer's disease have been linked to oxidative stress processes.

The both enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems can help to balance free radicals within the body. Through various investigations, it has been shown that various sulfur compounds, as glutathione, are excellent antioxidants. However, most of these studies donnot have given details of the mechanisms by which these antioxidants react with oxidizing agents. In computational chemistry we can find tools to help us for the study of the antioxidant free-radical systems, in more detail.

This work consists in the theoretical study of the antioxidant activity of four sulfur compounds against oxygen free radicals: lipoic acid, dihydrolipoic acid, cysteine and tiopronin. The study was made considering existing species under physiological conditions, ie, at $\text{pH} = 7.4$.

In the first stage of this study the primary antioxidant activity of the above four compounds are analyzed. Within this, the hydrogen abstraction mechanisms and electronic transfer were studied. The second stage was to determine the secondary antioxidant capacity of lipoic acid and dihydrolipoic acid, ie how these compounds form coordination complexes with copper, which, help prevent hydroxyl radicals are formed through the cycle Haber-Weiss. By the third stage was tested how the dihydrolipoic acid repair proteins.

The results show the high antioxidant capacity of these sulfur compounds against various oxygen free radicals. Dihydrolipoic acid, zwitterionic cysteine and anionic tiopronin, which have at least one thiol group, preferentially react by hydrogen abstraction from this group with free radicals of different reactivity. The anionic cysteine and the dianionic tiopronin, although they are in lower percentage at $\text{pH} 7.4$ than their respective protonated compounds, react by electron transfer with diffusion controlled rate constants. It showed that the dihydrolipoic acid, in addition to being an excellent free radical scavenger, is also a good copper chelating agent and repair of damage proteins by radical free.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos están constantemente expuestos a diversas especies reactivas de oxígeno (ERO), dentro de las cuales encontramos a los radicales libres. Las ERO provienen de distintas fuentes, las cuales pueden ser de tipo endógeno o exógeno. Pueden ser formadas como subproductos del metabolismo, de la autooxidación de xenobióticos, como resultado del estrés, como el ejercicio excesivo, algún trauma o infección. Adicionalmente, factores ambientales como la radiación y la contaminación pueden ser causas de la formación de ERO.

Dentro de ciertos límites, la formación de ERO es esencial para mantener la homeostasis celular. La excesiva producción de estas especies resulta en estrés oxidativo originando la activación de mecanismos de señalización específica y daño en general, la cual resulta en enfermedad o muerte. Enfermedades como accidentes cardio-vasculares, determinados tipos de cáncer, particularmente de pulmón y piel, envejecimiento precoz, arterosclerosis y el desarrollo del mal de Alzheimer han sido relacionados con procesos de estrés oxidativo^{1,2,3}.

Los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, pueden ayudar a mantener en equilibrio las especies reactivas de oxígeno. Un compuesto antioxidante puede ser definido como cualquier molécula capaz de prevenir, retardar o revertir la oxidación de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.

Como antioxidantes primarios, el mecanismo más conocido que pueden llevar a cabo se refiere a la capacidad que tienen muchos antioxidantes para actuar como “atrapadores” o “estabilizadores” de diversas especies reactivas. En el caso de los radicales libres, tal acción implica su estabilización a través de la cesión de un electrón a dichas especies reactivas. Tal mecanismo, definido como transferencia electrónica simple (TES), permite que el radical libre pierda su condición por “apareamiento” de su electrón desapareado. Una consecuencia para el antioxidante es que, como resultado de ceder un electrón, éste se convierte en un radical libre y termina oxidándose a una forma que es de nula o baja reactividad hacia su entorno. Junto a este mecanismo, muchos antioxidantes pueden estabilizar radicales libres a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno. Aunado a los mecanismos de transferencia electrónica y transferencia de hidrógeno, ciertos antioxidantes pueden actuar también estabilizando especies reactivas a través de un mecanismo que implica la adición directa del radical a su estructura, es decir, forman aductos de adición.

Los iones metálicos contribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) principalmente en reacciones Fenton o reacciones tipo Fenton donde metales endógenos como Fe^{2+} o Cu^+ reaccionan con peróxido de hidrógeno para generar el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Los antioxidantes secundarios pueden formar complejos con metales como el hierro y el cobre y disminuir, de esta forma, la producción de radicales hidroxilo.

A pesar de existir diversos compuestos que previenen la oxidación celular, ésta es inevitable. Las proteínas por ser macromoléculas muy abundantes en los organismos presentan alta susceptibilidad al ataque de ERO. Las proteínas juegan diferentes papeles en las células y

tejidos y están envueltos en la mayoría de los procesos en los organismos biológicos.⁴ La acumulación de proteínas oxidadas está asociada con diversas enfermedades como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, síndrome de insuficiencia respiratoria, distrofia muscular, artritis reumatoide, progeria y síndrome de Werner.⁵ En estos casos, los antioxidantes también pueden actuar como reparadores del daño provocado por las ERO y mantener el equilibrio celular.

En este trabajo estudiamos la actividad antioxidante de cuatro compuestos sulfurados frente a radicales libres oxigenados, abarcando varios aspectos de ésta como: atrapadores de radicales libres, formadores de compuestos de coordinación y reparadores del daño por radicales libres a biomoléculas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Funcional M06-2X

El desarrollo continuo de funcionales de intercambio y correlación mejorados es esencial para expandir las aplicaciones de la Teoría de Funcionales de la Densidad de Kohn–Sham (DFT). En los últimos 5 años, se ha avanzado mucho, principalmente debido a la inclusión de la densidad de energía cinética, en los llamados funcionales meta-GGA^{6,7,8,9,10} y la optimización sistemática de funcionales de intercambio y correlación contra amplias y diversas bases de datos.

Los funcionales de Minnesota son un grupo de funcionales de intercambio y correlación aproximada, parametrizados, basados en la teoría de Funcionales de la Densidad (DFT). Estos fueron desarrollados por el grupo de Donald Truhlar de la Universidad de Minnesota y están basados en aproximaciones meta-GGA. Estos funcionales son usados ampliamente para cálculos en química cuántica tradicional y física del estado sólido.

El funcional M06-2X¹¹ es clasificado como un funcional híbrido dentro de la aproximación meta-GGA. Este funcional con el 54% de intercambio Hartree-Fock es altamente recomendado para estudios de termoquímica y cinética de los elementos del grupo principal. Es uno de los mejores funcionales para el estudio de interacciones no covalentes. Sin embargo, no es recomendado para sistemas multirreferenciales como en la termoquímica con la mayoría de los metales de transición y en la organometálica.

2.2 Funciones de base.

La mayoría de las implementaciones de los métodos basados en la función de onda, los métodos semiempíricos y los métodos de funcionales de la densidad se basan en la aproximación de Roothaan, que permite representar un orbital molecular como una combinación lineal de orbitales atómicos previamente optimizados y llamados conjuntos de funciones de base. El conjunto de funciones de base permite así obtener una representación de los orbitales de un sistema químico, siendo parte del modelo químico junto con el método teórico.

El factor más importante que se debe considerar en la elección de un conjunto de base es el número de funciones y la precisión deseada. La base más pequeña disponible se denomina base mínima, ya que solo incorpora las funciones de base necesarias para contener todos los electrones de los átomos neutros. Una mejora que se le puede incorporar a ésta es aumentar el tamaño de la base, doblando todas las funciones para producir lo que se llama base doble zeta. El camino hacia bases más completas lleva a bases triple zeta, que triplican la base mínima. Este tipo de multiplicación de bases puede evitar tocar los orbitales internos (*core*), generando las bases triple zeta de valencia dividida; la progresión continúa a las bases cuádruple zeta y quíntuple zeta.

Las funciones de base desarrolladas por Pople se describen de la manera k-nlmG y pertenecen al tipo de valencia dividida. El término k antes del guion indica el número de funciones gaussianas primitivas que se usan para representar a los orbitales internos y los números nlm expresan tanto el número de funciones en que se dividieron los electrones de valencia como la cantidad de funciones gaussianas primitivas empleadas para su representación.

La duplicación de valencia permite cambiar el tamaño de los orbitales pero no su forma. Las bases con polarización evitan esta limitación al incorporar orbitales con mayor momento angular respecto al requerido para la descripción del estado basal de cada átomo; así se integran las funciones con polarización.

La incorporación de funciones difusas permite a los orbitales ocupar un espacio mayor. Son importantes porque al describir mejor la parte final de la función de onda también describen mejor a los electrones que se encuentran distantes del núcleo.

En este trabajo dependiendo del tamaño del sistema se usaron funciones doble o triple zeta en todos los casos con funciones de polarización y funciones difusas (6-31+G(d,p) o 6-311+(d,p)).

2.3 Modelos de solvente continuo.

El desarrollo de los modelos de solvente dieléctrico continuo ha facilitado el estudio de reacciones químicas en fase condensada de una forma eficiente computacionalmente. Estos métodos han sido parametrizados para obtener valores relativamente precisos de energías libres de solvatación, las cuales pueden proporcionar exactitud a valores de energía libre en fase gaseosa para obtener la correspondiente energía libre en solución.

2.3.1 Modelo de solvatación universal (SMD).

Usando un conjunto de instrucción de 2821 energías libres de solvatación que incluyen 274 valores para solutos neutros en agua, 2072 para solutos neutros en 90 disolventes no acuosos, 143 valores de energías libres de transferencia entre agua y 15 disolventes orgánicos, y 332 valores para iones en acetonitrilo, dimetilsulfóxido metanol y agua, se desarrolló un modelo de disolvente implícito universal llamado SMD para predecir energías libres de solvatación tanto de solutos neutros como iónicos en agua y disolventes no acuosos.

Descripción.

El modelo SMD está basado en un tratamiento del campo de reacción autoconsistente de las contribuciones electrostáticas de bulto que envuelve una integración de la ecuación de Poisson no homogénea y en un protocolo de cavidad-dispersión-disolvente-estructura para la contribución no electrostática a la energía libre de solvatación.

La energía libre de solvatación del estado estándar, que es la energía libre del estado estándar obtenida de transferir el soluto de la fase gas a la fase condensada, puede ser descrita de la siguiente forma

$$\Delta G_S^0 = \Delta G_{ENP} + \Delta G_{CDS} + \Delta G_{conc}^0 \quad (2.1)$$

El subíndice ENP en la ecuación 1.1 denota los componentes electrónicos (E), nuclear (N) y de polarización (P) de la energía libre. El componente de la relajación nuclear del término ENP es igual a la diferencia entre la energía total en fase gas calculada en la estructura de equilibrio en fase gas y la energía total en fase gas calculada en la estructura de equilibrio en fase líquida. El subíndice CDS enfatiza que el correspondiente término es normalmente asociado con el cambio de energía libre asociado con la cavitación del solvente (C), cambios en la energía de dispersión (D) y posibles cambios en la estructura local del disolvente (S). El término final en la ecuación 1.1 se considera para el cambio de concentración entre el estado estándar de la fase gas y el estado estándar en la fase líquida.

Parametrización

La parametrización en SMD se enfoca en dos tipos de parámetros: 1) el radio atómico usado para la construcción de las cavidades utilizadas en los cálculos de las contribuciones electrostáticas y 2) los parámetros involucrados en el cálculo de las tensiones superficiales atómicas y en la tensión superficial molecular. Estos parámetros están optimizados sobre 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*.

2.4 Transferencia electrónica. Teoría de Marcus

En una reacción de transferencia electrónica no hay enlaces químicos que se rompan o que se formen, por lo que para la realización de cálculos cinéticos es necesario un tratamiento distinto a las que reacciones donde esto sí ocurre.

Bill Libby¹² en un simposium en 1952, señaló que cuando un electrón es transferido de una molécula a otra, las dos moléculas o iones formados se encuentran en un ambiente erróneo del disolvente, ya que los núcleos de las moléculas de éste no tienen tiempo de moverse durante la transferencia del electrón. Rudolph A. Marcus¹³ asumió que tenía que haber fluctuaciones en varias coordenadas nucleares de las moléculas de disolvente al pasar de reactivos a productos.

La energía potencial del sistema U_r , reactivos más disolvente, es función de muchas coordenadas relevantes del sistema, coordenadas que incluyen la posición y la orientación de las moléculas individuales del solvente y las coordenadas de los reactivos. De forma similar, después de la transferencia electrónica las moléculas de reactivos tienen las cargas iónicas apropiadas para formar los productos de la reacción, y así la función de energía potencial U_p es productos más disolvente. Estas dos superficies de energía potencial se pueden intersectar si el acoplamiento que conduce a la transferencia electrónica es ignorado. Para un sistema de

N coordenadas, esta intersección ocurre en una superficie de N-1 dimensiones, la cual constituye, para esta aproximación, el estado de transición de la reacción.

Debido al efecto del acoplamiento electrónico insignificante y al acoplamiento del movimiento nuclear cerca de la superficie de intersección S, una transferencia electrónica puede ocurrir en S, como se muestra en la figura 2.1

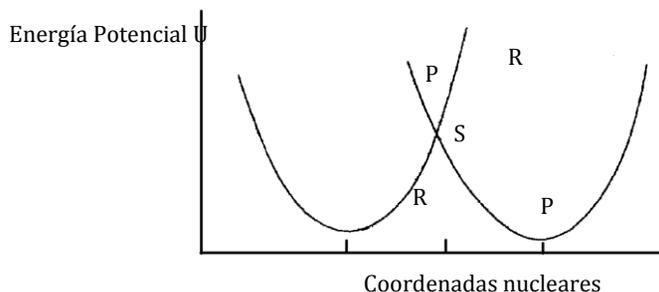


Figura 2.1 Perfil de superficies de energía potencial para reactivos más disolvente, R, y productos más disolvente, P, intersección, S.

Las energías potenciales U_r y U_p en el espacio de coordenadas multidimensionales son funciones simples de las coordenadas, pero son funciones complicadas de las cientos de coordenadas relevantes del disolvente, es decir, hay muchos mínimos locales que corresponden a arreglos locales estables de las moléculas de disolvente. Sin embargo, Marcus introdujo una “aproximación lineal responsable” en la cual, cualquier cambio hipotético en la carga de los reactivos produce un cambio proporcional en la polarización dieléctrica del disolvente. Con esta aproximación lineal las energías libres G_r y G_p llegan a ser funciones cuadráticas simples de la coordenada de reacción. Esto permite una descripción de la reacción en términos de gráficas de energía libre parabólicas (Figura 2.2).

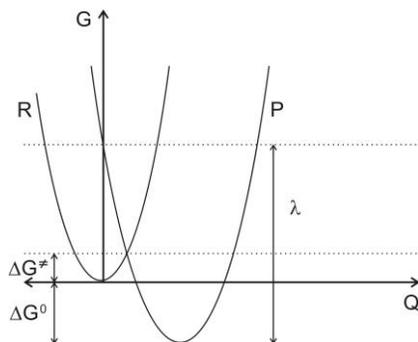


Figura 2.2. Energía libre de reactivos más disolvente vs coordenada de reacción q (curva R) y energía libre de productos más disolvente vs coordenada de reacción q (curva P).

En la figura 2.2, ΔG^0 es el cambio en la energía libre de Gibbs entre reactivos y productos, ΔG^\ddagger es la energía de activación y λ la energía de reorganización. Para determinar las constantes de velocidad para este tipo de reacciones es necesario conocer el valor que toma la energía de activación, que es justo donde estas dos parábolas se cruzan. Para esto, consideramos que el fondo de la parábola que describe la energía de los reactivos se sitúa en el origen del sistema

de coordenadas (0, 0) y así la ecuación que describe esta parábola es $y = x^2$. Si esto es cierto y, además, asumimos que la segunda parábola (que describe la energía de los productos) es igual que la primera, sólo que se encuentra desplazada, la ecuación que la describe sería $(y-b) = (x-a)^2$. En otras palabras el fondo de la segunda parábola se encuentra en el punto (a,b). Así, lo que tenemos que hacer es encontrar el valor para y en que las dos rectas se intersectan:

Ecuación de la parábola G_r :

$$y = x^2 \quad (2.2)$$

Ecuación de la parábola G_p :

$$(y - b) = (x - a)^2 \text{ o } y = x^2 - 2ax + a^2 + b \quad (2.3)$$

Combinando ambas ecuaciones:

$$x^2 = x^2 - 2ax + a^2 + b$$

$$x = \frac{(b + a^2)}{2a}$$

O de la ecuación 2.2:

$$y = x^2 = \frac{(b + a^2)^2}{4a^2} \quad (2.4)$$

Es necesario recordar que el valor para la coordenada y en la intersección de las dos parábolas es ΔG^\ddagger , así que tenemos una ecuación para este valor. Además, b que es el desplazamiento entre las dos parábolas en la dirección del eje y representa el valor para ΔG . Finalmente, el desplazamiento entre las dos parábolas en la dirección del eje x , a^2 , es λ . Sustituyendo todos estos valores tenemos:

$$\Delta G^\ddagger = \frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda} = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda}\right)^2 \quad (2.5)$$

Y la expresión para la constante de velocidad será:

$$k = Ae^{-\frac{-(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}} = Ae^{-\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2.6)$$

Esta expresión nos permite calcular el valor para la constante de velocidad en una transferencia electrónica.

2.5 Reacciones controladas por difusión.

Existen circunstancias, conocidas en la química industrial y en los sistemas biológicos, bajo las cuales las velocidades de transferencia de masa son comparables con las velocidades de las

reacciones químicas. La difusión de una especie química hacia otras en fenómenos como la disolución, lleva más tiempo por las grandes distancias para ser difundidas. A nivel molecular, las distancias de difusión son cortas (≈ 1 nm) así que sólo los eventos muy rápidos pueden ser influenciados por estos tiempos de difusión cortos. Esto limita el número de sistemas a algunos relativamente pocos, donde la velocidad a la cual los reactivos se aproximan uno a otro es lenta o comparable con la velocidad a la cual los reactivos reaccionan químicamente.

La teoría de Smoluchowski, de reacciones en disolución, las cuales ocurren a velocidades limitadas sólo por la rapidez con la que los reactivos pueden aproximarse uno al otro, es utilizada para calcular constantes de velocidad para este tipo de reacciones.

Ecuación de difusión. Constante de velocidad de Smoluchowski

Smoluchowski sugiere que los reactivos A y B tienen que difundirse hasta que estén lo suficientemente cerca para reaccionar. De una forma sencilla de explicar esa teoría, se asume que se tiene una molécula de A "estática" y que las moléculas de B se difunden en el medio. Esto está esquematizado en la figura 2.3:

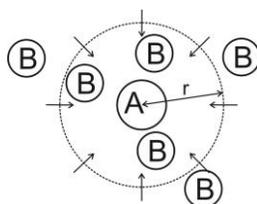


Figura 2.3. Diagrama de difusión de las moléculas de B hacia A.

Siempre que una molécula de B entre en contacto con una de A la reacción ocurre y B desaparece. La distancia crítica entre A y B necesaria para que la reacción ocurra es R^* la cual se puede asumir igual a la suma de los radios moleculares de A y B,

$$R^* = R_A + R_B. \tag{2.7}$$

La concentración local de B en la vecindad de A no es uniforme. $[B] = 0$ a $r = R^*$ e incrementa hasta la concentración de bulto, $[B]$ a $r = \infty$ donde r es la distancia entre A y B (figura 2.4).

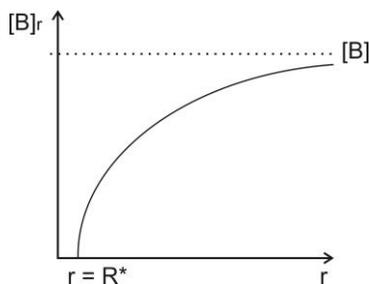


Figura 2.4. Variación de $[B]$ con respecto a la distancia r .

El flujo de B hacia A está dado por la primera ley de Fick de difusión, la cual, establece que el flujo en cualquier dirección (flujo de moléculas por unidad de área por unidad de tiempo) es proporcional al gradiente de concentración en esta dirección,

$$\Phi_B = -D_B \nabla C_B. \quad (2.8)$$

El flujo Φ_B y el gradiente de concentración son vectores y D_B es la constante de difusión de B es la constante de proporcionalidad en la ecuación de Fick. El signo menos indica que el flujo es en la dirección donde la concentración decrece.

En el caso de simetría esférica como en el flujo de moléculas B hacia A, la ecuación de Fick es:

$$\Phi_B = -D_B \frac{d[B]_r}{dr} \quad (2.9)$$

Donde $[B]_r$ es la concentración de B a una distancia r de A.

El número total de moléculas difundiéndose a través de una capa esférica de radio r por unidad de tiempo está dada por

$$J = 4\pi r^2 |F_B| = 4\pi r^2 D_B \frac{d[B]_r}{dr} \quad (2.10)$$

Bajo condiciones de estado estacionario, tal que el gradiente de concentración es independiente del tiempo, el flujo de moléculas (J) es una constante independiente de r, es decir, el número total de moléculas por unidad de tiempo que pasa por cualquier capa esférica es el mismo.

La ecuación 2.10 es fácilmente integrable resolviendo para $[B]_r$,

$$\int_{[B]_r}^{[B]} d[B]_r = \int_r^{\infty} \frac{J}{4\pi r^2 D_B} dr \quad (2.11)$$

Lo cual da

$$[B] - [B]_r = \frac{J}{4\pi r D_B}, \quad (2.12)$$

o bien,

$$[B]_r = [B] - \frac{J}{4\pi r D_B}. \quad (2.13)$$

La concentración de moléculas B se aproxima a la concentración de bulto, [B], cuando r se aproxima a ∞ y cae como $1/r$ cerca de A.

Aplicando las condiciones de frontera, $r = R^*$ y $[B]_r = 0$, y resolviendo para J,

$$J = 4\pi R^* D_B [B] \quad (2.14)$$

Esta solución es para el caso cuando se tiene una sola molécula de A asumiendo que se encontraba estacionada con sólo las moléculas de B difundiéndose. Cuando ambos reactivos se difunden, el flujo relativo de B y A hacia cada uno está dado por,

$$J = 4\pi R^* (D_A + D_B) [A][B] \quad (2.15)$$

Para una reacción bimolecular controlada por difusión, la velocidad a la cual los productos se forman es precisamente la velocidad a la cual A y B fluyen hacia cada una:

$$\frac{dP}{dt} k_d [A][B] = 4\pi R^* (D_A D_B) [A][B] \quad (2.16)$$

Así, la constante de velocidad de una reacción limitada por difusión es:

$$k_d = 4\pi R^* (D_A + D_B) \quad (2.17)$$

con unidades de m³/s en unidades del SI. Para convertir estas unidades en M⁻¹ s⁻¹ multiplicamos por el número de Avogadro y un litro por 10⁻³ m³,

$$k_d = 4\pi R^* (D_A + D_B) N_A 10^3 M^{-1} s^{-1} \quad (2.18)$$

A la expresión (2.18) se le denomina constante de velocidad de Smoluchowski.

El coeficiente de difusión para una molécula de radio a difundiéndose en un disolvente de viscosidad η está dado por la relación de Stoke-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2.19)$$

3. ANTECEDENTES

3.1 Estrés oxidativo.

Dentro de las especies reactivas de oxígeno (ERO) se encuentran una gran cantidad de radicales libres oxigenados, son subproductos inevitables de la respiración celular que facilitan la oxidación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El daño causado por las ERO es una de las causas principales de diversas enfermedades, dentro de las que se incluyen el cáncer, y enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson.^{14,15} Las células tienen sofisticados sistemas regulatorios antioxidantes que mantienen un apropiado balance de las ERO, con lo cual se mantiene un equilibrio homeostático; sin embargo, la ruptura en la homeostasis puede resultar en estrés oxidativo y lesiones en los tejidos.^{16,17} En diversos estudios se ha demostrado que metales, como el hierro, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel y vanadio generan ERO.¹⁸ La contribución de iones metálicos a la generación de ERO está comúnmente en reacciones Fenton o reacciones tipo Fenton donde metales endógenos como Fe^{2+} o Cu^{+} reaccionan con peróxido de hidrógeno para generar el radical hidroxilo ($\cdot OH$).¹⁹

En 1954, la argentina Rebeca Gerschman²⁰ señaló por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades. Por otro lado, Denham Harman²¹ en 1956, relacionó a los radicales libres con el envejecimiento y con los padecimientos crónicos de mayor prevalencia en esta etapa de la vida. Es importante aclarar que los radicales libres son componentes normales de la fisiología celular e incluso tienen un papel fundamental en la homeostasis del organismo, como por ejemplo, en los mecanismos inmunológicos, en la regulación del tono vascular y agregación plaquetaria, en la tensión del oxígeno en la ventilación pulmonar, en la producción de eritropoyetina, así como, en la señalización en la transducción de receptores de membrana en varios procesos fisiológicos.²²

Los antioxidantes combaten el daño oxidativo causado por las ERO y varios estudios se han enfocado en el papel que desempeñan los antioxidantes para el tratamiento y prevención de enfermedades.²³ Antioxidantes como polifenoles,²⁴ compuestos que tienen azufre²⁵ y selenio,²⁶ antioxidantes enzimáticos²⁷ como la superóxidodismutasa y la glutatión peroxidasa, y micronutrientes como las vitaminas C²⁸ y E²⁹, han sido extensamente investigadas y en numerosos estudios se han demostrado sus propiedades antioxidantes.

3.2 Antioxidantes sulfurados.

El azufre es un componente esencial en funciones fisiológicas normales y se encuentra incorporado en aminoácidos, proteínas, enzimas y micronutrientes³⁰. Los humanos satisfacen sus necesidades nutricionales de azufre consumiendo vegetales y productos animales en su dieta como, leche, queso, cebolla, ajo, huevo, fruta, entre otros. En numerosos estudios se han demostrado las propiedades antioxidantes de algunos de los compuestos que contienen azufre como cisteína, metionina, taurina, glutatión, ácido lipoico y N-acetil cisteína (Figura 3.1).^{30,31,32}

La metionina es un aminoácido esencial obtenido a través de la dieta y es el recurso primario de azufre en el cuerpo.^{30,31} Este aminoácido es un donador de grupos metilo y es requerido para la síntesis de proteínas; también se ha descrito^{33,34} su actividad como atrapador^a de radicales. La cisteína es requerida para la síntesis de proteínas y glutatión (GSH)¹⁹, también juega un papel importante en la estructura de las proteínas debido a que forma entrecruzamientos por puentes disulfuro que estabilizan la conformación de ciertas proteínas.³⁵ Otros compuestos derivados de los aminoácidos también son esenciales para las funciones biológicas. La taurina se deriva del metabolismo de la metionina y la cisteína, o bien, se obtiene a través de la dieta.³⁰ Sus funciones primarias incluyen la modulación de los niveles de calcio, detoxificación y la conjugación del ácido biliar.³¹ El N-acetilcisteína (NAC) es un intermediario en la síntesis del glutatión a partir de la cisteína, es un transportador de la cisteína, atrapador de sustancias reactivas de oxígeno, repone los niveles de glutatión y se ha estudiado ampliamente por sus propiedades antioxidantes.^{30,36,37}

El GSH es el compuesto, que contiene un grupo tiol y que no está unido a una proteína, más abundante encontrado en la célula, con concentraciones intracelulares de 1–15 mM.³⁸ El glutatión es uno de los mejores compuestos antioxidantes en la célula, actúa como agente detoxificante para especies radicales endógenas y como un cofactor esencial para la enzima glutatión peroxidasa, algunos estudios indican que la protección no enzimática contra radicales libres, específicamente radicales oxigenados, es también una función primaria.³⁹ Adicionalmente, el balance óxido-reducción del glutatión (GSH/GSSG) y cisteína/cistina en las células ha sido un indicador biológico del estrés oxidativo y de la progresión de enfermedades.⁴⁰ Jones y col.⁴¹ han estudiado extensamente el balance óxido-reducción del glutatión y de la cisteína en la célula y encontraron que el glutatión reducido y la cisteína llegan a ser oxidadas en respuesta al estrés oxidativo, el envejecimiento y enfermedades cardiovasculares. Además, durante el envejecimiento, las concentraciones celulares de GSH decrecen, una característica asociada al incremento de daño oxidativo.⁴⁰

El ácido lipoico es un compuesto sintetizado enzimáticamente en la mitocondria a partir del ácido octanoico. Éste es un cofactor necesario para complejos multienzimáticos que catalizan la descarboxilación oxidativa de α -ceto ácidos y, por tanto, desempeña un papel crítico en el metabolismo energético mitocondrial. Tanto el ácido lipoico como su forma reducida, el ácido dihidrolipoico, tienen propiedades antioxidantes sustanciales, entre las que se incluyen la disminución de los niveles y la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno, así como también, el reciclar otros antioxidantes.⁴²

^a Del inglés scavenge

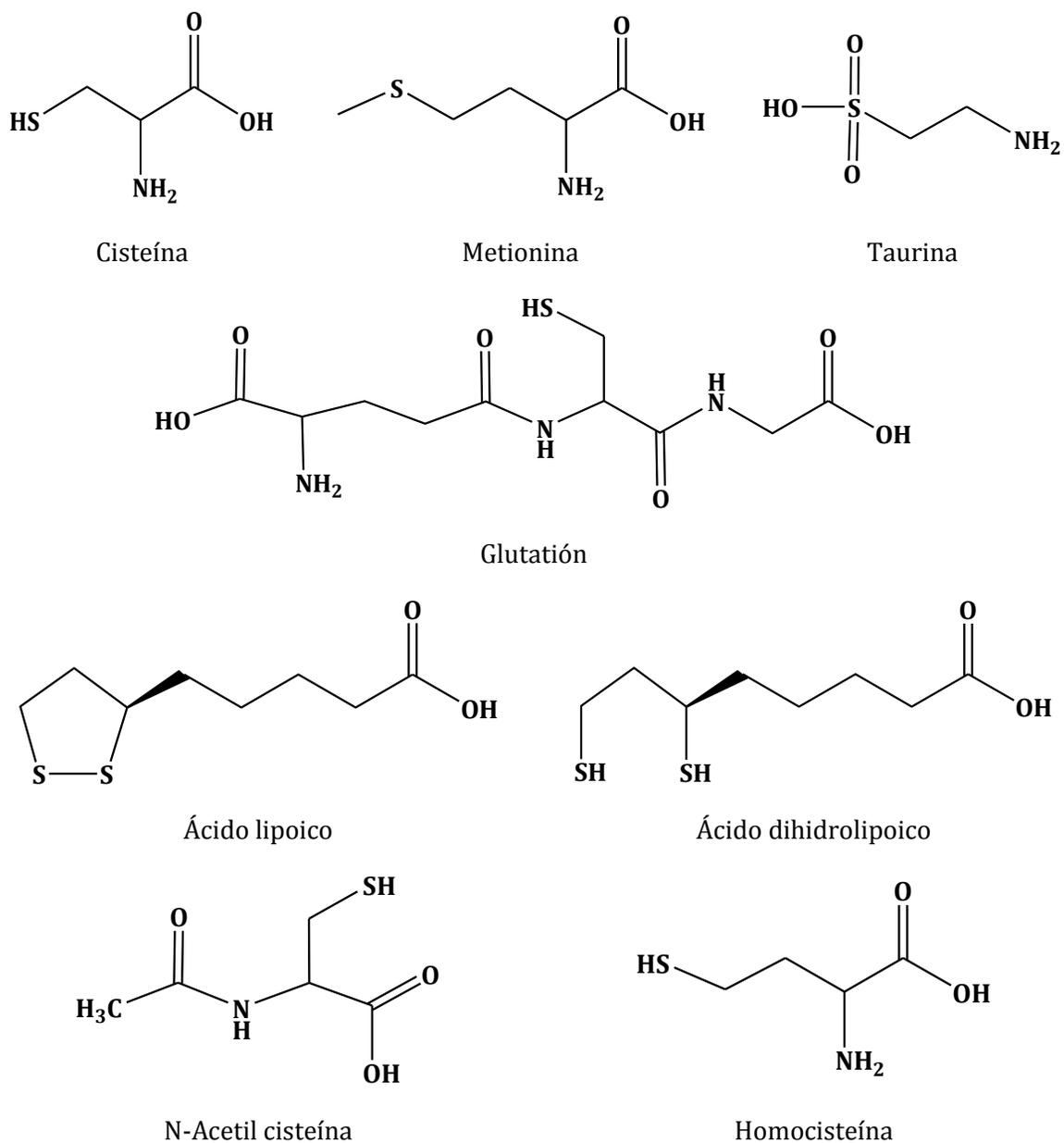


Figura 3.1. Compuestos antioxidantes sulfurados.

3.2.1 Estudios celulares e in vivo con antioxidantes sulfurados.

Numerosos estudios que se han enfocado en el uso de compuestos que contienen azufre en el tratamiento y prevención de enfermedades han establecido el efecto antioxidante de varios de estos compuestos. Estos estudios destacan particularmente la necesidad de futuras investigaciones debido a los conflictos entre resultados, particularmente entre aquellos que se enfocan en los mecanismos de la actividad de antioxidantes sulfurados. Además, las condiciones experimentales pueden variar ampliamente y las propiedades antioxidantes de los compuestos sulfurados son, frecuentemente, simplificadas cuando son comparadas sin tener en cuenta las diferencias en los diseños experimentales y los métodos.

Un estudio reciente demostró que la cisteína y la homocisteína inhibían la toxicidad por cadmio en líneas celulares de hepatitis II, previniendo la generación de ERO a través de la formación de un compuesto de coordinación tiol – cadmio⁴³. Otros estudios donde se investigó el papel de los aminoácidos que contienen azufre en la carcinogénesis inducida por cadmio, revelaron que, en un pretratamiento de células de leucemia crónica K562, redujeron la concentración de ERO.³⁶ El metabolismo anormal del estrógeno puede resultar en mutaciones de ADN implicadas en la formación de cáncer de mama; sin embargo, en un estudio se ha sugerido el posible uso de suplementos de NAC para la protección contra la genotoxicidad de estrógeno.⁴⁴ Venogopal y colaboradores⁴⁴ probaron la viabilidad celular de células epiteliales de mamas de ratón (E6) expuestas a estrógeno-3,4-quinonas y NAC. Sus estudios revelaron un decremento en la formación de aductos dañinos (una reducción del 63-90%), con esto sugieren al NAC como una posibilidad para prevenir el cáncer de mamá. La N-acetilcisteinamida (NACA) previene los efectos citotóxicos del glutamato, previniendo la peroxidación lipídica, atrapando ERO y manteniendo los niveles celulares de GSH en células PC12, las cuales están implicadas en desordenes como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson.³⁷ Otros estudios, donde se investigaban las complicaciones diabéticas y enfermedades cardiovasculares, encontraron que el NAC previene la resistencia a la insulina y la hipertensión en ratas. En estos estudios, las ratas ingirieron una alta dosis de fructosa, causando un incremento en la resistencia insulínica, alta presión sanguínea y elevado estrés oxidativo. Estos síntomas fueron atenuados significativamente cuando se les administró NAC, sugiriendo, para éste, un papel protector tanto en diabetes como en enfermedades cardiovasculares.⁴⁵

Kaufmann y col.⁴⁶ demostraron que la administración de glutamina a ratas expuestas al cancerígeno 7,12-dimetilbenzantraceno causó un incremento en la concentración de GSH, correlacionando a una reducción del 50% en la generación de tumores mamarios. Investigaciones donde se examinó una dieta suplementada con metil-cisteína en moscas de fruta demostraron un incremento en la actividad de la metionina sulfóxido reductasa bajo condiciones de estrés oxidativo, y establecieron ésta como una causa fundamental de la enfermedad de Parkinson.⁴⁷ La toxicidad mediada por metilmercurio y muerte neuronal por la generación de ERO en neuronas simpáticas de pollo se previnieron por cisteína y glutatión, pero no por metionina.⁴⁸ Una investigación reciente en la cual se estudió el efecto cardioprotector de la taurina, se encontró que la deficiencia de ésta en el corazón, causada por una baja regulación del gen transportador de taurina, causó disfunción cardiaca extrema (defectos físicos, resistencia reducida, atrofia y fallas cardiacas) en ratones.⁴⁹

Estudios epidemiológicos indicaron que, compuestos sulfurados derivados de ajo, tuvieron efectos preventivos contra diversos tipos de cáncer, de manera notable, contra cáncer de próstata, de mama, de estómago y colorectal.^{32,50} Además, otros estudios que correlacionaron el consumo de vegetales que contienen estos compuestos, indujeron disminución en la incidencia de cáncer de próstata, de estómago y de esófago.⁵¹ Li y colaboradores⁵² observaron un decremento significativo en la incidencia total de cáncer (22%), particularmente con cáncer gástrico, con la administración de altas dosis de allitrium a un grupo de personas de

entre 35 y 74 años de edad. Se observaron benéficos efectos del ajoeno en estudios de cáncer de piel y colorectal.⁵³

Muchos de los trabajos de investigación acerca de las propiedades protectoras del glutatión han demostrado efectos tanto benéficos como perjudiciales. Por ejemplo, los niveles de glutatión en pacientes con cáncer de mama son más bajos en sangre debido a la detoxificación del estrés oxidativo. En contraste, se observaron altos niveles de GSH en tejidos de cáncer de mama, sugiriendo que el GSH puede contribuir a mejorar la proliferación celular y la resistencia al estrés oxidativo.⁵⁴ Efectos similares se observaron en otros ensayos clínicos, donde niveles elevados de GSH están asociados con la resistencia a fármacos y a la radiación.^{55,56} Según Zeevalk y colaboradores⁵⁷ el agotamiento en los niveles de glutatión conduce a la generación de ERO y es una predicción temprana de estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson.

El tratamiento de células PC12 con ácido lipoico previene el agotamiento de GSH y previene el daño oxidativo asociado con la enfermedad de Parkinson.⁵⁸ Como es de esperarse, la función del GSH en la enfermedad de Alzheimer es similar, y pacientes con discapacidad cognitiva leve presentaron niveles reducidos de glutatión oxidado.⁵⁹ Derivados de GSH, incluyendo al S-lauroil glutatión y S-palmitoleil glutatión también reducen las concentraciones de ERO, lo cual puede hacer a estos compuestos potencialmente útiles para el tratamiento para la enfermedad de Alzheimer.⁶⁰

El incremento en los niveles de homocisteína es asociado con patologías cardiovasculares, y la reducción en estos resultó en una reducción del 16% en lesiones isquémicas del corazón y una reducción del 24% en ataques fulminantes.⁶¹ Adicionalmente, la cistina y la cisteína aumentan la oxidación, mediada por homocisteína, de lipoproteínas de baja densidad en presencia de cobre, un proceso asociado con la aterosclerosis⁶². Las funciones inmunes mejoraron en pacientes con VIH con una suplementación con NAC.⁶³ La toxicidad con plomo, asociada con patologías neurológicas, inmunológicas, reproductivas y circulatorias, se redujo con los antioxidantes sulfurados N-acetilcisteína y ácido lipoico.⁶⁴

Se ha demostrado que la interacción del ácido lipoico con componentes regulatorios de la cascada de señalización de insulina tiene beneficios funcionales en los músculos esqueléticos al consumir glucosa, tolerancia a la glucosa en el cuerpo humano en general y ayuda contra la resistencia a insulina en modelos animales.^{65,66} También se observó una mejora en la disposición de la glucosa en pacientes humanos con diabetes tipo II que recibían ácido lipoico, tanto en forma oral como intravenosa.^{66,67}

3.2.2 Capacidad antioxidante primaria. Atrapadores de radicales libres.

La habilidad de compuestos sulfurados para atrapar ERO ha sido investigada como un posible mecanismo antioxidante para estos compuestos. Los compuestos Allium (derivados de especies vegetales del género Allium) son conocidos antioxidantes sulfurados y Kim y colaboradores examinaron esta actividad para cinco compuestos Allium (Figura 3.2): S-alil-L-cisteína (ALI), S-alil-L-cisteína sulfóxido (SAC),⁶⁸ dialil sulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS) y

dialil trisulfuro (DATS).⁶⁹ Ellos determinaron que solo la SAC y el ALI protegieron efectivamente a células neuronales isquémicas del daño a concentraciones de 1-100 μM y de 10-100 μM , respectivamente. Estos dos compuestos también atraparon efectivamente al $\cdot\text{OH}$ *in vitro*, pero no tienen efecto en los niveles de H_2O_2 y del $\text{O}_2^{\cdot-}$. En contraste, DATS y DADS fueron atrapadores eficientes del $\text{O}_2^{\cdot-}$, pero no del H_2O_2 , ni previnieron del daño neuronal. A partir de estos resultados los autores sugieren que los compuestos Allium podrían proveer neuroprotección de ERO implicados en la neurodegeneración.⁶⁹

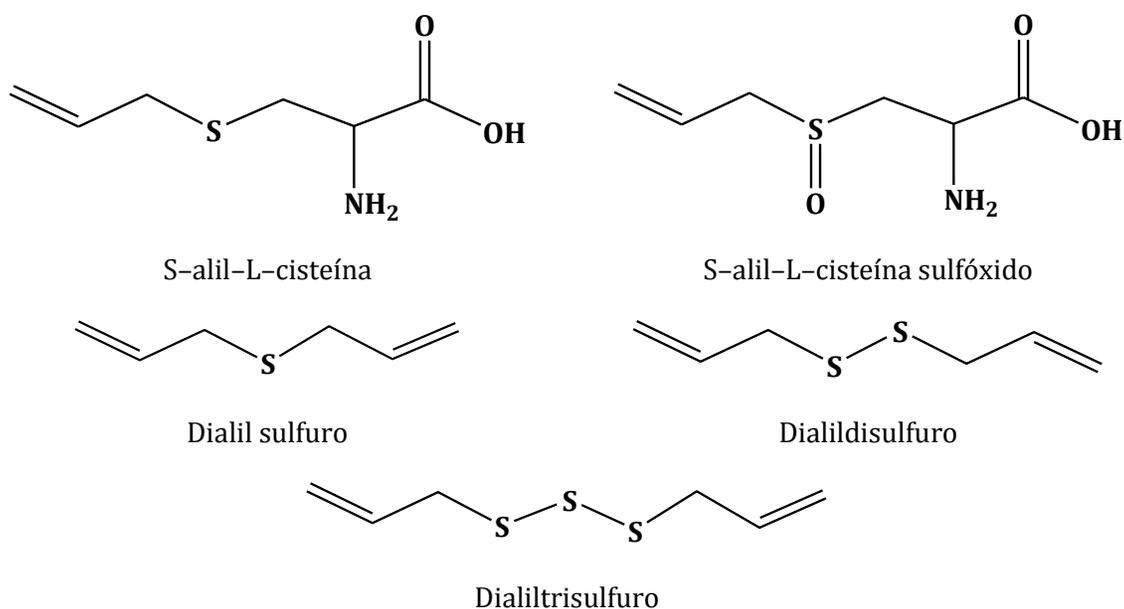


Figura 3.2. Compuestos antioxidantes *Allium*

Ates y colaboradores⁷⁰ determinaron la actividad atrapadora de H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ de la NAC y la NACA usando espectroscopía UV-Vis, y comparada con la actividad para el ácido ascórbico. Con altas concentraciones (~ 0.8 - 1.5 M) la NAC tuvo la mayor actividad para el H_2O_2 . Sin embargo, con la mayor concentración (~ 3 M) la NACA tuvo $\sim 10\%$ más actividad que la NAC. Para el $\cdot\text{OH}$ la NAC tuvo la mayor actividad atrapadora en todas las concentraciones utilizadas, la máxima actividad ($\sim 73\%$) se obtuvo con una concentración de 1.2 M, la máxima actividad para la NACA a esa misma concentración fue de $\sim 57\%$. En comparación con los resultados obtenidos con el ácido ascórbico, éste tuvo la menor actividad tanto para el $\cdot\text{OH}$ como para el H_2O_2 . Aunque estos resultados indican que la NAC y la NACA son eficientes atrapadores *in vitro* a altas concentraciones, concentraciones intracelulares menores pueden disminuir la eficacia de estos compuestos *in vivo*.

Se encontró que el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico son altamente reactivos con una variedad de ERO *in vitro*. El ácido lipoico en concentraciones de 0.05 - 1 mM atrapa al $\cdot\text{OH}$, al HClO y al $^1\text{O}_2$. El ácido dihidrolipoico presentó esta reactividad con el $\cdot\text{OH}$, HClO , ERO muy reactivos, $\cdot\text{OOR}$ y el $\text{O}_2^{\cdot-}$, que son mucho menos reactivos que los anteriores, con concentraciones de 0.01 - 0.05 mM.^{42,71}

3.2.3 Capacidad antioxidante secundaria. Formación de complejos de coordinación.

Además de los mecanismos atrapadores de ERO para compuestos sulfurados, la unión de éstos con metales puede también proporcionar protección contra el daño oxidativo celular. Muchos estudios han demostrado la presencia de pozos de hierro y cobre no unidos a proteínas en las células y hay una correlación entre la concentración de iones metálicos con enfermedades y daño celular.^{72,73} Los compuestos sulfurados protegen del daño oxidativo de iones como Cu^+ o Fe^{2+} , y esta actividad antioxidante observada ocurre a concentraciones biológicas mediante la formación de compuestos de coordinación con los metales.⁷⁴ Así, la habilidad de los compuestos que contienen azufre para coordinarse con los metales es extremadamente importante para prevenir la formación de ERO. Miyoshi y colaboradores⁷⁵ describieron la estructura cristalina de rayos X de un complejo violeta de glutatión-cobre II. También describieron complejos metionina-metal para Cr^{3+} , Mn^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Bi^{3+} , Rh^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Ag^{2+} .^{76,77} Se observaron complejos metal-azufre para la cisteína y metil-cisteinato con Hg^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} ,^{77,78} y para metil-cisteína con Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Pd^{2+} y Pt^{2+} .^{78,79} A partir de estos estudios, es claro que los compuestos biológicos sulfurados se coordinan fácilmente con iones metálicos, y que esta habilidad puede prevenir significativamente la generación de $\cdot\text{OH}$, estrés oxidativo y enfermedades.

Existen extensas revisiones en la literatura de los efectos de los compuestos que contienen azufre, en la prevención de enfermedades. Debido a la naturaleza compleja de muchas de estas patologías, los estudios *in vivo* y clínicos no han proporcionado evidencia directa para los mecanismos de los antioxidantes sulfurados. Se requiere más trabajo para determinar cómo los compuestos sulfurados ejercen sus efectos antioxidantes, en cuanto a los mecanismos de acción, para desarrollar antioxidantes sulfurados más efectivos para la prevención de enfermedades.

3.3 Reparación de biomoléculas con antioxidantes.

Debido a la abundancia de las proteínas y su alta tendencia a reaccionar con constantes de velocidad altas con muchas especies químicas estas se convierten en el mayor blanco para los oxidantes biológicos. La extensión del ataque en un sitio particular de la proteína depende de múltiples factores. En algunos casos, el daño es limitado a un sitio específico mientras que con otras especies (como el $\cdot\text{OH}$), el daño es extenso y no específico. Además, en este último caso, las proteínas dañadas pueden contener grupos muy reactivos que pueden facilitar el daño secundario hacia otras biomoléculas.^{80,81}

Cuando el daño a proteínas no se repara, la oxidación puede causar su fragmentación, agregación, desdoblamiento e interacción alterada con otras proteínas, etc. Como resultado de la exposición a radicales libres, pueden ocurrir muchos cambios en las proteínas, incluyendo modificación de aminoácidos, pérdida de su función (ya sea enzimática, estructural o de señalización),⁸² cambios en sus espectros de absorción y fluorescencia⁸³ o incremento en la susceptibilidad proteolítica.⁸⁴

Hoey y Butler⁸⁵ han investigado la reacción de transferencia radicalica entre radicales de triptófano y varios antioxidantes naturales y sintéticos. Ellos han extendido sus estudios a la reparación de radicales de triptófano y tirosina en lisozima, su sistema enzimático modelo. Hoey y Butler también mostraron que el α -tocoferol, el ácido úrico y el ácido ascórbico son capaces de reaccionar con radicales de triptófano; sin embargo, las proteínas oxidadas son reparadas ineficientemente por el α -tocoferol, mientras que el ácido úrico y el ácido ascórbico son mucho mejores antioxidantes. Domazou y col.⁸⁶ han medido las constantes de velocidad para las reacciones entre ácido ascórbico y radicales generados en proteínas. Los valores de estas constantes para los radicales de triptófano en diferentes proteínas son $(2.2-18) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Un estudio reciente informó los valores de constantes de velocidad para la reducción de radicales en aminoácidos aromáticos y en proteínas, en ausencia de O_2 , por antioxidantes como, urato, ascorbato, glutatión, flavonoides, vitamina E y su análogo, Trolox.⁸⁷

Muchos estudios se han sido diseñado para probar la posibilidad de que radicales generados por ERO puedan oxidar moléculas con grupos tiol como el GSH.⁸⁸⁻⁹⁰ Los estudios *in vitro* de la oxidación de GSH por radicales de triptófano en la lisozima, los cuales fueron generados por radiólisis de pulsos, informaron de una constante de velocidad de $(1.05 \pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^{88,89} Reciente, se informó de una constante de velocidad de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reparación de radicales de tirosina por glutatión fueron recientemente estimadas en ausencia de ascorbato.⁹⁰ Sin embargo, ninguna investigación previa en esta área ha abordado el estudio del mecanismo de la reparación de otros aminoácidos en las proteínas dañadas.

3.4 Estudios teóricos con antioxidantes sulfurados.

En los últimos años, una gran variedad de antioxidantes se han estudiado mediante métodos computacionales, en los que se obtuvieron interesantes resultados en cuanto a sus mecanismos de reacción. Dentro de estos estudios se incluyen compuestos que contienen azufre y que, experimentalmente, han probado tener actividad antioxidante. Galano y Francisco-Marquez⁹¹, utilizando la teoría de funcionales de la densidad, demostraron que la metionina reacciona con el $\cdot\text{OH}$ cien veces más rápido en comparación con la norleucina, un aminoácido con estructura similar a la metionina, pero sin azufre. Esto lo hace en las posiciones cercanas al átomo de azufre. Por otro lado, también demostraron que el ácido 2-propensulfénico, uno de los productos de eliminación Cope de la alicina, reacciona con el $\cdot\text{OOH}$ 1000 más rápido que la alicina misma, por lo que se concluye que la actividad antioxidante de ésta última se debe al ácido 2-propensulfénico.⁹²

En un estudio por Galano y Álvarez-Idaboy⁹³ acerca de la actividad antioxidante del GSH con una variedad de radicales oxigenados, demostró que éste reacciona exclusivamente por abstracción de hidrógeno y que, a excepción de la reacción con $\cdot\text{OH}$, el canal de reacción más importante es el del grupo tiol de la cisteína que compone este tripéptido. Por otra parte, ellos estudiaron mediante diferentes mecanismos, la reparación por el GSH al ADN dañado por radicales libres.⁹⁴ En este estudio, los resultados hicieron evidente que dicha reparación se lleva a cabo casi exclusivamente por medio de transferencia de hidrógeno del grupo tiol, con

constantes de velocidad $\sim 10^7\text{--}10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estos valores, que se encuentran cercanos al límite por difusión, demuestran la gran capacidad del glutatión para prevenir el daño permanente al ADN y así reducir los efectos provocados por el estrés oxidativo. Este último estudio, nos hace pensar que, compuestos antioxidantes con grupos tiol, como el ácido dihidrolipoico, puedan llevar a cabo la reparación al ADN con velocidades similares a las encontradas para el glutatión. Por esto, antioxidantes con estas características, son buenos candidatos para realizar estudios de reparación al ADN.

4. OBJETIVOS

General

Estudiar los mecanismos antioxidantes de los compuestos sulfurados: cisteína, ácido lipoico, ácido dihidrolipoico y tiopronina. Comparar entre las diferentes reacciones propias de cada mecanismo antioxidante y entre los diferentes compuestos sulfurados estudiados y, así, establecer la importancia de la presencia del átomo de azufre y otros factores en su capacidad antioxidante.

Particulares

- Realizar un estudio, mediante métodos computacionales de la Mecánica Cuántica, del mecanismo antioxidante atrapador de radicales de diferentes compuestos que contienen azufre y son conocidos antioxidantes: de la cisteína, el ácido lipoico, el ácido dihidrolipoico y la tiopronina. Este mecanismo se estudiará en medio acuoso, lipídico o ambos, dependiendo de la solubilidad de los compuestos sulfurados.
- Estudiar los tipos de reacción que este mecanismo incluye, es decir, transferencia electrónica y abstracción de hidrógenos con conocidos radicales libres oxigenados de diversa reactividad ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{OOCH}_3$, $\cdot\text{OOCHCH}_2$ y $\cdot\text{OCCl}_3$), en todas las posiciones posibles. Determinar cuál o cuáles de estas reacciones son las que se llevan a cabo principalmente en cada compuesto estudiado, así como en qué posición de la estructura de cada compuesto se favorece la reacción.
- Determinar la forma en que el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico interactúan con el Cu^{2+} para formar complejos de coordinación en medio acuoso y si los átomos de azufre juegan un papel importante dentro de los complejos más estables ácido lipoico- Cu^{2+} y ácido dihidrolipoico- Cu^{2+} .
- Establecer si los complejos de cobre con ácido dihidrolipoico disminuyen la constante de velocidad para la reacción inicial del ciclo de Haber-Weiss y, por tanto, la producción de radicales hidroxilo.
- Estudiar la reparación de radicales centrados en carbono de la N-formil-leucinamida con ácido dihidrolipoico, como modelo de residuo proteico dañado, mediante el mecanismo de transferencia de hidrógeno de sus grupos tiol.

5. METODOLOGÍA COMPUTACIONAL

Para la realización de esta investigación se utilizaron métodos de funcionales de la densidad (DFT), los cuales han sido aplicados exitosamente con anterioridad en el grupo para predecir ΔG s de reacción y de activación, mecanismos de reacción y constantes de velocidad.^{95,96,97,98,99} La metodología que a continuación se describe fue propuesta por Annia Galano y J. Raúl Álvarez-Idaboy¹⁰⁰ y ha sido probada para varios antioxidantes, reproduciendo valores experimentales, termodinámicos y cinéticos, con precisión.

En este trabajo se evaluaron tres aspectos reconocidos experimentalmente en los antioxidantes: actividad antioxidante primaria, actividad antioxidante secundaria y reparación de biomoléculas. Éstas nos dieron valiosa información para conocer la forma en que estos antioxidantes reaccionan.

Primera etapa. Actividad antioxidante primaria.

Para evaluar este tipo de capacidad antioxidante, estudiamos el mecanismo atrapador de radicales libres de diversos antioxidantes sulfurados. Se analizaron dos reacciones dentro de este mecanismo:

- *Transferencia electrónica,*
- *Abstracción de hidrógeno.*

Se analizó cada una de las dos reacciones con todos los antioxidantes, a su vez, cada antioxidante frente a radicales de diversa reactividad: $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{OOCH}_3$, $\cdot\text{OOCHCH}_2$ y $\cdot\text{OCCl}_3$, todos radicales centrados en oxígeno.

Se modeló cada una de las estructuras que intervendrán en cada reacción a analizar, es decir, reactivos (antioxidantes y radicales), estados de transición y productos. A todas las especies modeladas se les realizó una optimización de geometría y cálculo de frecuencias, usando el funcional M06-2X y la base 6-31++G(d,p). Los mínimos locales y estados de transición se identificaron mediante el número de frecuencias imaginarias (NIMAG), NIMAG=0 para los mínimos y NIMAG=1 para los estados de transición. Los efectos de solvente fueron incluidos usando el modelo SMD. Todo lo anterior se hizo utilizando el paquete de programas Gaussian 09¹⁰¹. El funcional arriba mencionado, así como el método de solvente, son recomendados para cálculos termodinámicos y cinéticos y utilizados por varios investigadores para este propósito.^{102,103,104} Para verificar que cada estado de transición encontrado conecta correctamente con los reactivos y productos se hicieron cálculos de Coordenada Intrínseca de Reacción.

Para determinar cuáles son las reacciones termodinámicamente favorables se calculó la diferencia de energía libre de Gibbs entre productos y reactivos, es decir, el ΔG de reacción (ΔG^0). Para aquellas reacciones que cumplieron con el criterio anterior y por tanto son exergónicas se calcularon sus ΔG^\ddagger y, con estos, sus constantes de velocidad.

Los efectos de solvatación fueron incluidos de acuerdo a las correcciones propuestas por Okuno,¹⁰⁵ tomando en cuenta la teoría de volumen libre.¹⁰⁶ Estas correcciones están en acuerdo con las obtenidas independientemente por Ardura y col.¹⁰⁷ La expresión usada para corregir la energía libre de Gibbs es:

$$\Delta G_{sol}^{FV} \cong \Delta G_{sol}^0 - RT\{\ln[n10^{(2n-2)}] - (n - 1)\} \quad (5.1)$$

Donde n representa la molecularidad de reacción. De acuerdo a la expresión 5.1 el efecto de solvatación causa una disminución en el ΔG de 2.54 kcal/mol para una reacción bimolecular, a 298.15 K.

Las constantes de velocidad asociadas a cada reacción de abstracción de hidrógeno se calcularán utilizando la Teoría del Estado de Transición^{108,109,110} y el estado estándar 1 M,

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT} \quad (5.2)$$

Donde k_B y h son las constantes de Boltzman y Plank, ΔG^\ddagger es la energía libre de Gibbs de activación ($G_{\text{estado de transición}} - G_{\text{reactivos}}$), σ representa el número de caminos de reacción degenerados, y κ es la corrección por efecto túnel el cual será calculado usando la aproximación del túnel por curvatura cero (ZCT por sus siglas en inglés: zero curvature tunneling) usando una barrera Eckart.^{111,112}

Para los mecanismos que envuelven transferencia electrónica, se utilizó la teoría de Marcus.^{113,114} Ésta depende del formalismo de la Teoría del Estado de Transición, para la cual se define una barrera de activación de transferencia electrónica (ΔG_{TE}^\ddagger) en términos de dos parámetros termodinámicos, la energía libre de reacción (ΔG_{TE}^0) y la energía de reorganización nuclear (λ)

$$\Delta G_{TE}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{TE}^0}{\lambda}\right)^2 \quad (5.3)$$

La energía de reorganización se calcula:

$$\lambda = \Delta E_{TE} - \Delta G_{TE}^0 \quad (5.4)$$

Donde ΔE_{TE} es calculada como la diferencia de energía (vertical) entre reactivos y productos en la geometría de reactivos.

Cuando algunos de los valores de las constantes de velocidad se encontraron cerca del límite por difusión, la constante de velocidad aparente (k_{ap}) no puede ser obtenida directamente a partir de cálculos utilizando la Teoría del Estado de Transición (Ec. 5.2). En el presente trabajo se utilizó la teoría de Collins-Kimball¹¹⁵ para corregir las constantes de velocidad (k) y las constantes de velocidad aparentes se calculan:

$$k_{ap} = \frac{k_D k}{k_D + k} \quad (5.5)$$

donde k es la constante de velocidad térmica obtenida de los cálculos utilizando la Teoría del Estado de Transición (Ec. 5.2) y k_D es la constante de velocidad del estado estacionario de Smoluchowski¹¹⁶ para una reacción bimolecular irreversible controlada por difusión:

$$k_D = 4\pi R D_{AB} N_A \quad (5.6)$$

donde R denota la distancia de reacción, N_A es el número de Avogadro y D_{AB} es el coeficiente de difusión mutua del reactivo A (radical libre) y B (antioxidante).

$$D_{AB} = D_A + D_B \quad (5.7)$$

D_A y D_B se calculan a partir de la aproximación de Stokes-Einstein¹¹⁷:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (5.8)$$

Donde k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura, η denota la viscosidad del solvente y a es el radio del soluto.

Segunda etapa. Actividad antioxidante secundaria.

Para evaluar la capacidad antioxidante secundaria, estudiamos la formación de los complejos de coordinación entre los ácidos lipoico y dihidrolipoico con Cu^{2+} y Cu^+ . Calculamos las constantes de formación de los complejos Cu^{2+} - (Ác. Lipoico)⁻ y Cu^{2+} - (Ác. Dihidrolipoico)⁻ utilizando la fórmula:

$$K_f = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}} \quad (5.9)$$

Donde ΔG^0 es la energía libre de formación del complejo ($G_{\text{complejo}} - G_{\text{reactivos}}$), R es la constante de los gases y T es la temperatura (298.15 K).

Las constantes de formación de los complejos Cu^{2+} - (Ác. Dihidrolipoico)²⁻ se calcularon mediante la fórmula:

$$K_f = e^{-\frac{(\Delta G^0 + \Delta G')}{RT}} \quad (5.10)$$

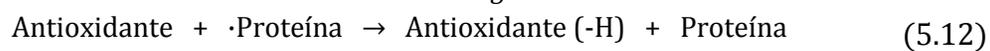
Donde

$$\Delta G' = 2.303RT (pK_a - pH) \quad (5.11)$$

Tercera etapa. Reparación de radicales en proteínas.

La última parte de este proyecto envuelve el estudio del mecanismo de la posible reparación del daño por radicales libres a moléculas biológicamente importantes como las proteínas. Para efectuar esta parte se hará lo mismo que en la primera, con la diferencia que los radicales serán modelos de proteína dañada (N-formil-leucinamina).

Abstracción de hidrógeno:



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1 ATRAPADORES DE RADICALES LIBRES

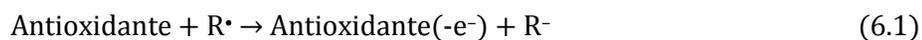
En este trabajo estudiamos tres formas en las que algunos compuestos sulfurados pueden actuar como antioxidantes en el cuerpo humano. Estos son:

- Como antioxidantes primarios, atrapadores de radicales libres.
- Como antioxidantes secundarios, formando complejos con metales transición.
- Reparadores de biomoléculas.

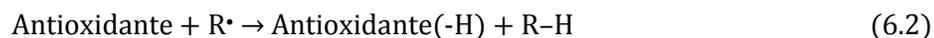
Analizaremos cada una de estas tres formas de manera independiente.

Como atrapadores de radicales libres, los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos. Por las características de los compuestos antioxidantes estudiados en este trabajo, sólo utilizamos dos mecanismos:

- *Transferencia electrónica*



- *Transferencia de hidrógeno*



Utilizamos 6 radicales con diferente reactividad: $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, $\bullet\text{OOCH}_3$, $\bullet\text{OOCHCH}_2$ y $\bullet\text{OCCl}_3$. El radical $\bullet\text{OH}$ ha sido incluido porque es comúnmente utilizado en experimentos y es el principal recurso del daño biológico en organismos vivos. El $\bullet\text{OCH}_3$ es un ejemplo de radicales alcoxilo. El radical $\bullet\text{OOH}$ es un radical de reactividad relativamente baja que es capaz de difundir a localizaciones celulares remotas ya que tiene tiempos de vida media del orden de segundos. El comportamiento de los radicales $\bullet\text{OOCH}_3$ y $\bullet\text{OOCHCH}_2$, que son ejemplo de radicales alquilperoxilo, es probablemente similar a los radicales peroxilo de gran tamaño, los cuales son abundantes en sistemas biológicos. Finalmente, el $\bullet\text{OCCl}_3$ es un modelo para radicales peroxilo muy electronegativos. Escogimos estos radicales debido a su importancia en los procesos de estrés oxidativo. Además, los radicales de intermedia a baja reactividad han sido recomendados para estudios sobre la actividad atrapadora relativa de radicales de diferentes compuestos.^{118,119}

Debido a que algunos antioxidantes son solubles tanto en agua como en medio lipídico, se llevó a cabo una optimización de geometría de los diferentes radicales libres, en ambos medios. Las estructuras correspondientes a los mínimos locales encontrados para estos seis radicales se encuentran en la figura 6.1.

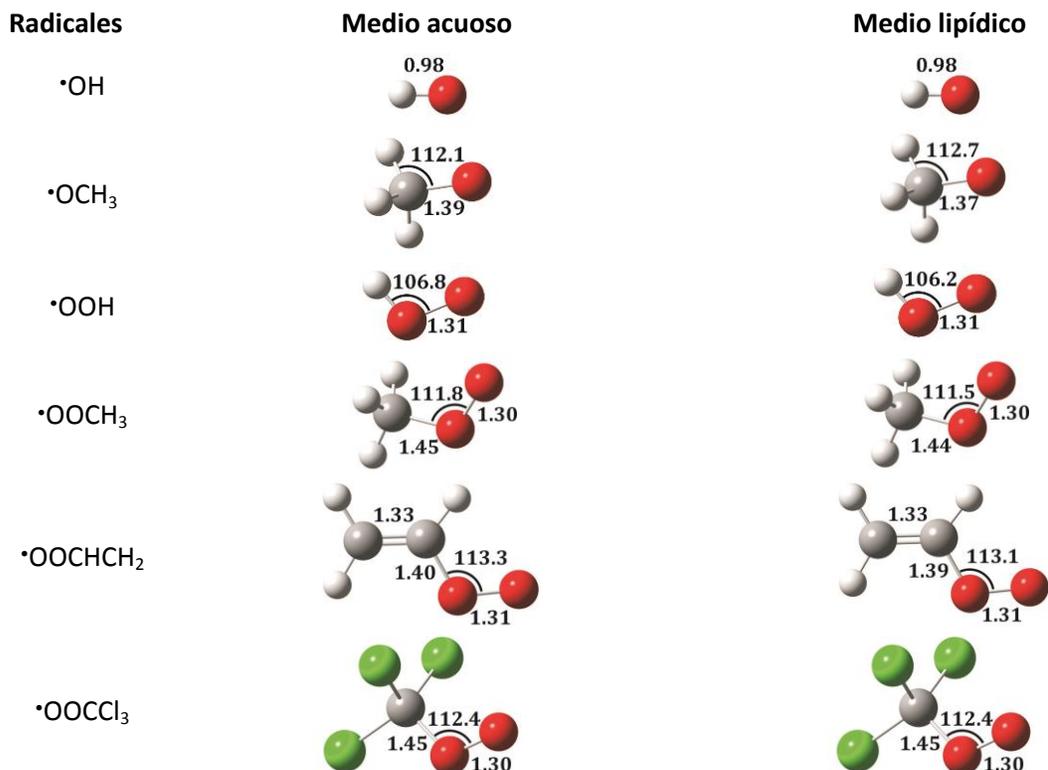


Figura 6.1. Estructuras optimizadas para seis radicales libres oxigenados en medio acuoso y en medio lipídico.

Para determinar, a nivel molecular, la capacidad antioxidante de los compuestos sulfurados como atrapadores de radicales libres utilizamos cuatro compuestos conocidos y estudiados experimentalmente:

- Cisteína
- Ácido lipoico
- Ácido dihidrolipoico
- Tiopronina

Para cada uno de estos antioxidantes hicimos un estudio termodinámico y un estudio cinético de las reacciones de transferencia electrónica y todas las posibles reacciones de abstracción de hidrógeno. Esto con el objetivo de determinar el o los mecanismos de reacción favorecidos en cada compuesto y la reactividad conferida a la molécula por la presencia de átomos de azufre.

6.1.1 ÁCIDO LIPOICO Y ÁCIDO DIHIDROLIPOICO.

El ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico son compuestos solubles tanto en agua como en disolventes orgánicos, por esta razón analizamos su capacidad antioxidante en ambos medios. En medio acuoso y a pH fisiológico (pH=7.4) el grupo carboxilo en ambos ácidos se encuentra

desprotonado, ya que los valores de pK_a reportados para la desprotonación de este grupo son 4.7–5.3 para el ácido lipoico y 4.85 para el ácido dihidrolipoico. Por esta razón, las especies que se encuentran presentes, bajo estas condiciones, son sus correspondientes bases conjugadas, es decir, el lipoato con una abundancia del 99.8% y el dihidrolipoato con el 99.7% de abundancia. Esto se puede determinar mediante una gráfica de fracción molar en función del pH. Las gráficas obtenidas teniendo en cuenta los valores de pK_a mencionados anteriormente, se encuentran en el apéndice A. Tomando esto en cuenta, el lipoato y el dihidrolipoato son las especies con las que haremos nuestro estudio en medio acuoso. En medio lipídico el grupo carboxilo se encuentra protonado y son el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico las especies a las que se les evaluarán sus propiedades antioxidantes.

Geometría.

Previo a cualquier cálculo termodinámico o cinético, un paso importante es determinar la estructura de cada una de las especies químicas involucradas en las reacciones a estudiar. Así, presentamos las geometrías para el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico, tanto en medio acuoso como en medio lipídico. Éstas se encuentran completamente optimizadas a mínimos locales con el nivel de cálculo M06-2x/6-31++G(d,p)//M06-2x/6-31++G(d,p) y están representadas en la Figura 6.2 con los valores principales de distancias de enlace y ángulos de enlace.

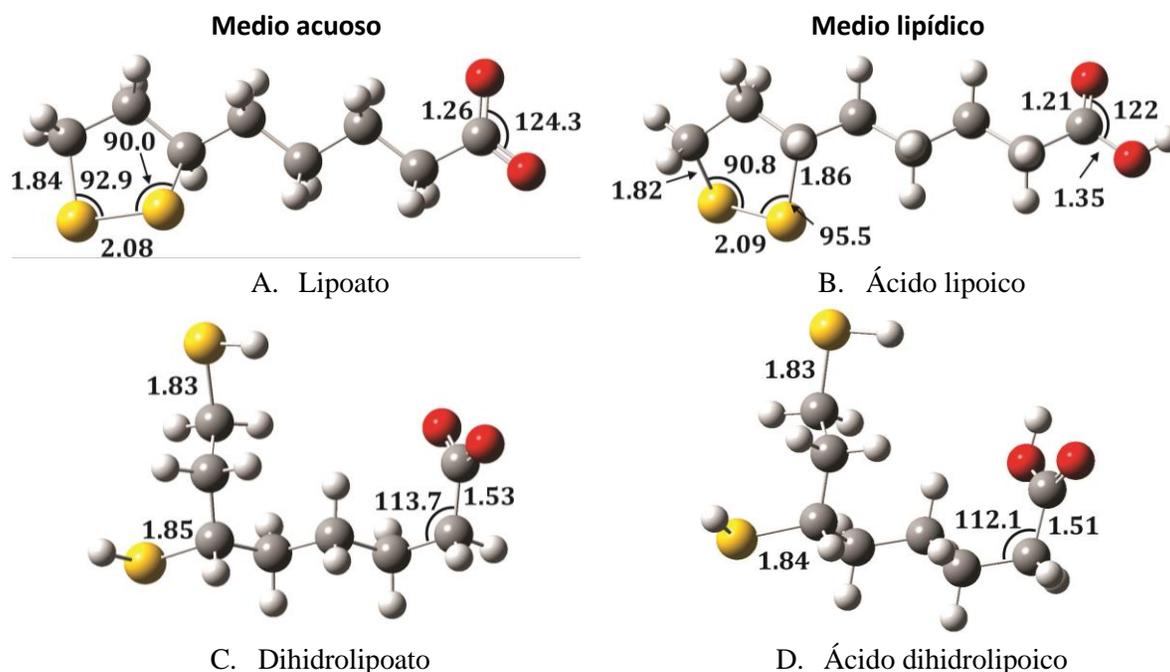
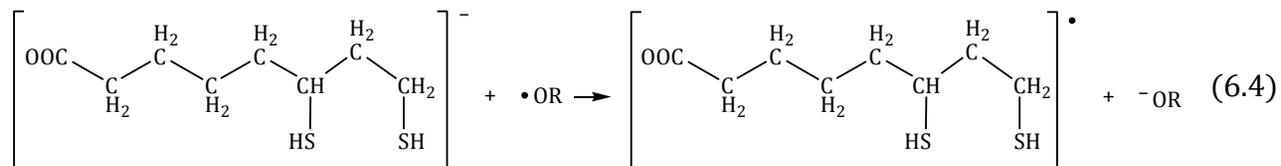
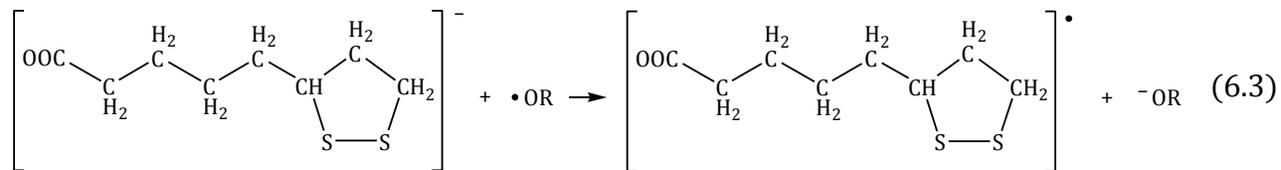


Figura 6.2. Estructuras optimizadas para el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico en medio acuoso y en medio lipídico.

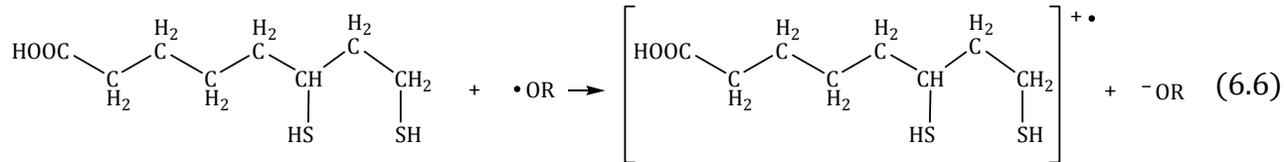
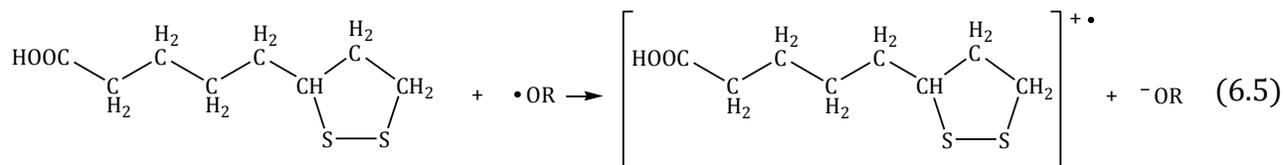
Las reacciones de transferencia electrónica y abstracción de hidrógeno para el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico son:

▪ Transferencia electrónica

Medio acuoso

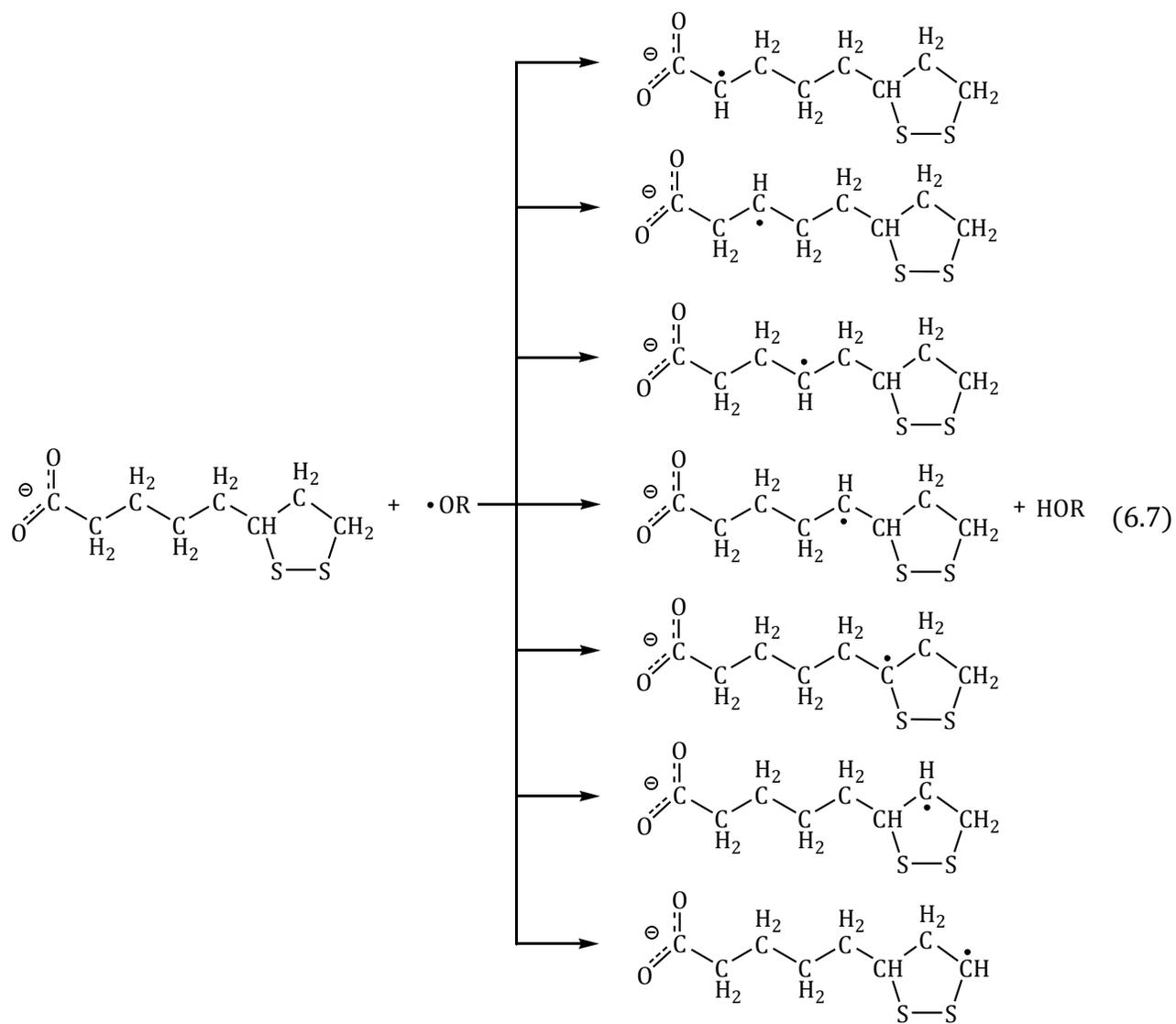


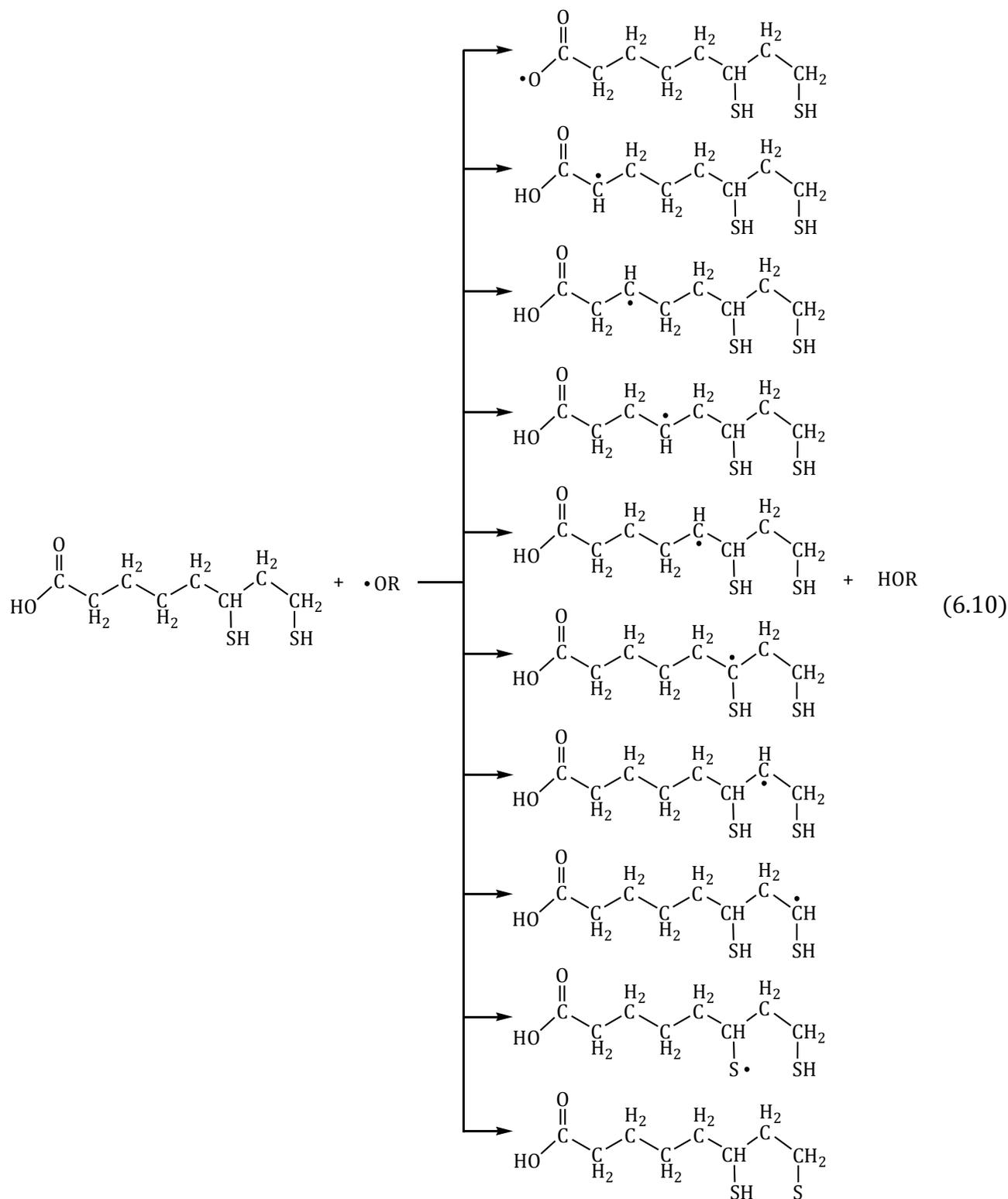
Medio lipídico



▪ Abstracción de hidrógeno

Medio acuoso





Ya que describimos la geometría de los reactivos, ahora discutiremos las geometrías de los productos que podrían formarse en cada mecanismo descrito en las reacciones 6.3–6.10. Es importante destacar que, en algunas reacciones, los reactivos podrían ser más estables que los

productos, en estos casos no sería necesario calcular sus constantes de velocidad, pero es importante tener en cuenta la geometría más estable en los productos para determinar, de primera instancia, si la reacción es o no favorecida termodinámicamente.

Las etiquetas establecidas para los diferentes átomos (carbono y azufre) en el lipoato, las cuales nos facilitarán el manejo de los resultados, son representadas en la figura 6.3, en esta misma figura se encuentran las etiquetas para los distintos átomos en el dihidrolipoato, el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico.

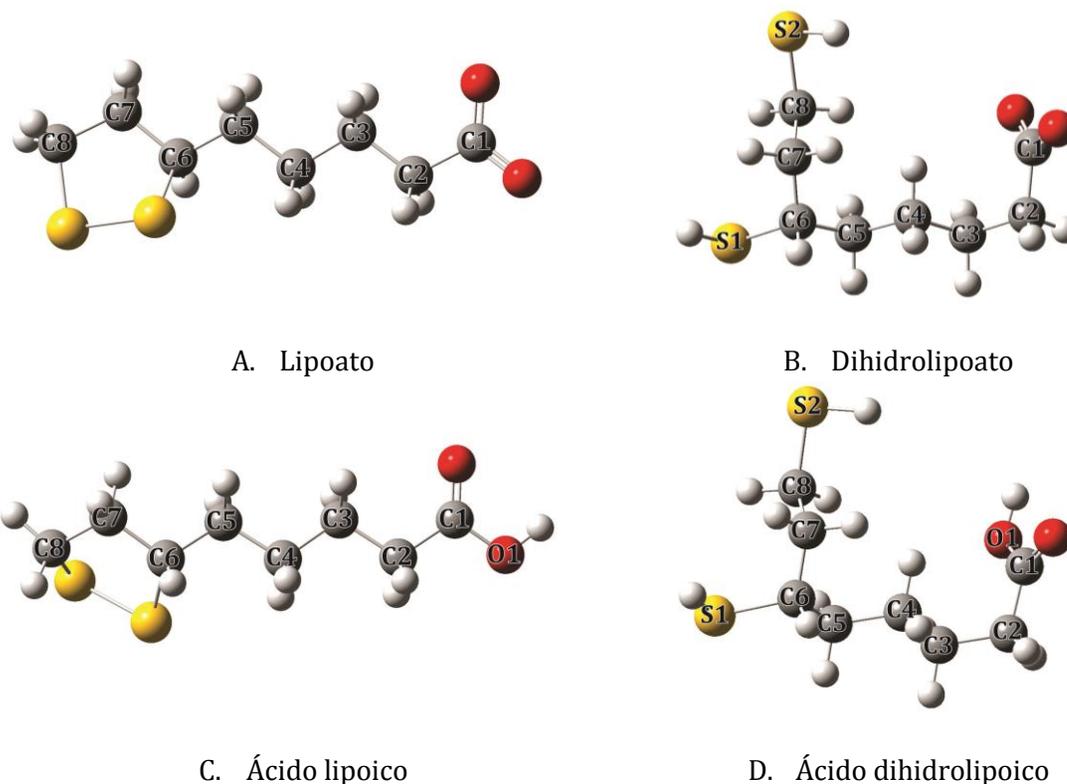


Figura 6.3. Etiquetas para los átomos en el lipoato y en el dihidrolipoato.

Transferencia electrónica.

En la transferencia electrónica el lipoato y el dihidrolipoato (que son aniones) formará el lipoato radical y el dihidrolipoato radical, respectivamente, mientras que el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico (especies neutras) formarán sus respectivos catión-radicales, cuyas geometrías se representan en la figura 6.4.

Si comparamos los valores en las distancias de enlace, ángulos de enlace y algunos ángulos diedros entre el lipoato anión (reactivo) y el lipoato radical (producto), encontramos que las mayores diferencias están en los valores en el anillo, siendo los más destacados, los ángulos formados entre C7-C8-S2, entre C8-S2-S1 y entre C6-S1-S2, así como los dos ángulos diedros: C5-C6-C7-C8 y C6-S1-S2-C8. Al comparar el dihidrolipoato anión (reactivo) y dihidrolipoato radical (producto), las mayores diferencias se tienen para los ángulos formados entre los átomos C8-S2-H y entre C7-C8-S2-H. Estos cambios en los ángulos y algunas distancias de

enlace alrededor de los átomos de azufre podrían deberse a que es en estos sitios de donde se transfiere el electrón en medio acuoso, más adelante se profundizará sobre este aspecto.

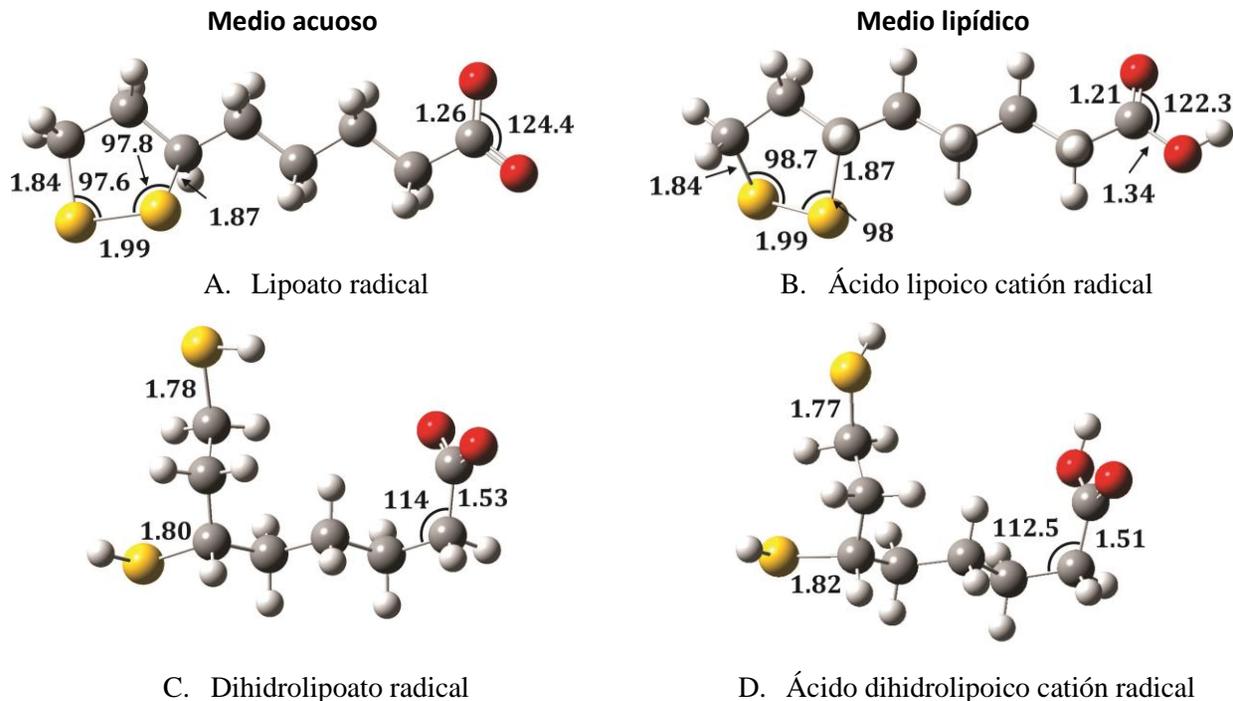


Figura 6.4. Estructuras optimizadas para los productos de la reacción de transferencia electrónica a partir del ácido lipoico y del ácido dihidrolipoico en medio acuoso y en medio lipídico.

Después de la transferencia electrónica en pentiletanoato, los valores en las distancias de enlace no cambian significativamente, ni para el ácido lipoico ni para el ácido dihidrolipoico. Podemos ver un ligero cambio en los enlaces entre C6-S1 y C8-S2. Mayores diferencias se pueden observar en los valores de los ángulos de enlace y ángulos diedrales. Al igual que en medio acuoso, en medio lipídico estas diferencias se presentan en los ángulos del anillo que contiene el enlace disulfuro, en el ácido lipoico, así como también en los ángulos cercanos a los grupos tiol en el ácido dihidrolipoico.

Abstracción de hidrógeno.

En el lipoato encontramos siete hidrógenos unidos a carbono en diferente ambiente químico y, por tanto, con la posibilidad de ser abstraídos por los radicales. Las abstracciones de estos hidrógenos han sido etiquetadas dependiendo del carbono al que están unidos y usando las etiquetas de los átomos descritos en la figura 6.3. Las abstracciones de los hidrógenos unidos a los átomos de azufre se etiquetaron de acuerdo a la posición que ocupa el carbono al que se encuentra unido, siendo el hidrógeno S1 el perteneciente al grupo tiol más cercano al grupo carboxilo y S2 el hidrógeno de grupo tiol más alejado. Los productos que se obtendrían de todas las posibles reacciones de abstracción de hidrógeno en el ácido lipoico y en el ácido dihidrolipoico, tanto en medio acuoso como en medio lipídico se presenta en las figuras 6.5 y 6.6

Es importante mencionar que las abstracciones de hidrógeno en los grupos $-\text{CH}_2-$, independientemente del hidrógeno que se abstraiga, originarán el mismo producto $-\dot{\text{C}}\text{H}-$. Dicho en otras palabras, la abstracción de cada uno de los dos hidrógenos de estos grupos dará como resultado una constante de velocidad con el mismo valor, es decir, son caminos de reacción degenerados. Por lo anterior, en el estudio cinético de estas reacciones sólo se calculará la constante de velocidad asociada a la abstracción de uno de estos hidrógenos y se multiplicará por dos ($\sigma = 2$, número de caminos de reacción degenerados).

Los productos de abstracción de hidrógeno en estos compuestos son independientes del radical con el que reaccione, es decir, son los mismos. En las figuras 6.5 y 6.6 se encuentran todas las geometrías producto de la abstracción de un hidrógeno, en medio acuoso y en medio lipídico. Tanto para el lipoato como para el ácido lipoico, la abstracción de uno de los hidrógenos de la cadena de carbonos modifica la geometría del carbono al que se le abstrae el hidrógeno, es decir, cambia de una geometría tetraédrica a una geometría trigonal, lo que ocasiona un ligero cambio en los ángulos diedros vecinos a ese carbono. Para el dihidrolipoato y el ácido dihidrolipoico ocurre lo mismo en la geometría de los carbonos a los que se les abstraen un hidrógeno con los radicales, en algunos de ellos, este cambio de geometría en el carbono permite que el grupo carboxilo y el grupo tiol en C8 se acerquen, como ocurre en la AH-C3 del dihidrolipoato y en la AH-C4 del ácido dihidrolipoico.

Los productos que formarán los radicales oxigenados utilizados en este estudio dependerán de la reacción que estén llevando a cabo. Después de una reacción de transferencia electrónica cada uno de los radicales oxigenados formará el anión correspondiente. Por otra parte, después de una reacción de abstracción de hidrógeno, el oxígeno que contiene el radical se hidrogenará. Las estructuras de los productos formados a partir de los radicales oxigenados se encuentran presentes en la figura 6.7, donde cada una tiene los principales valores en las distancias de enlace y ángulos de enlace.

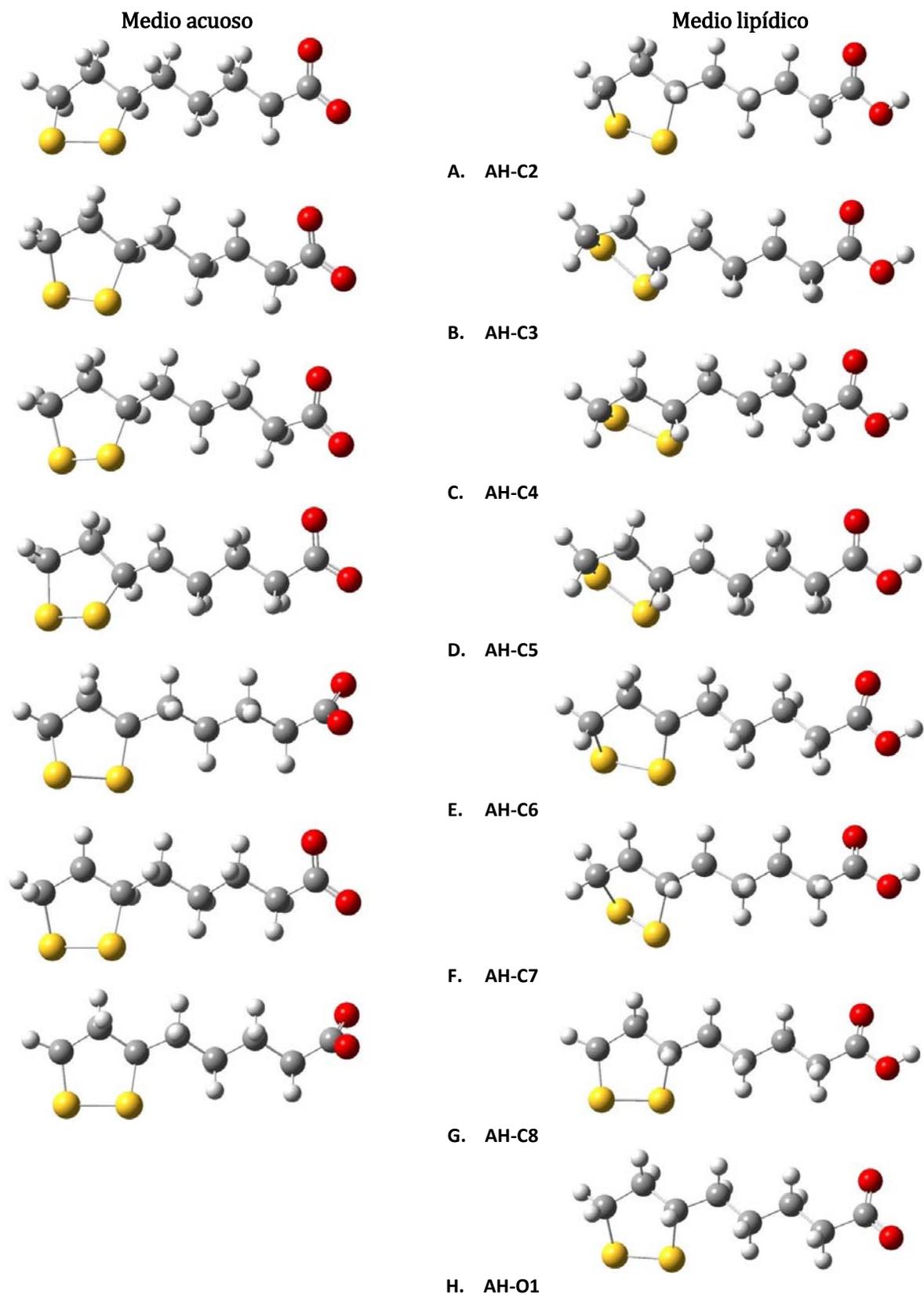
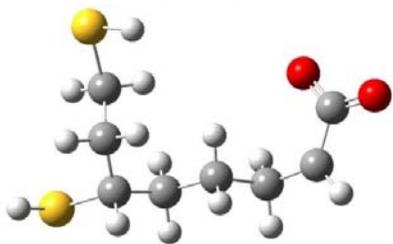
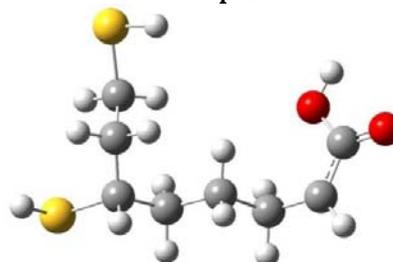


Figura 6.5. Estructuras optimizadas para los productos de la reacción de abstracción de hidrógeno a partir del lipoato y del ácido lipoico.

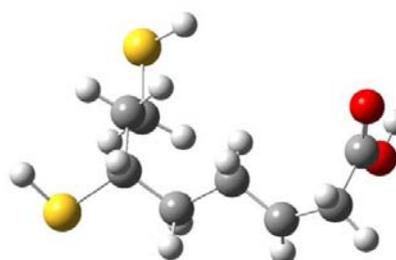
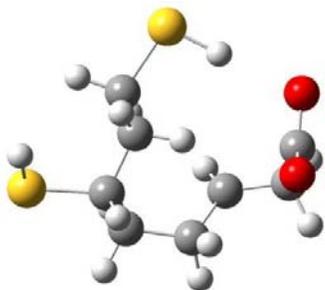
Medio acuoso



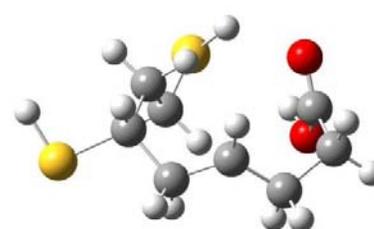
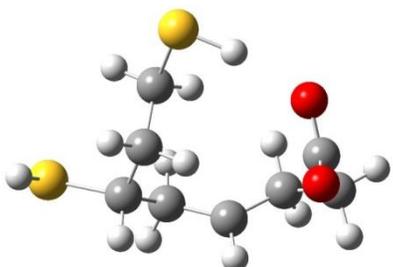
Medio lipídico



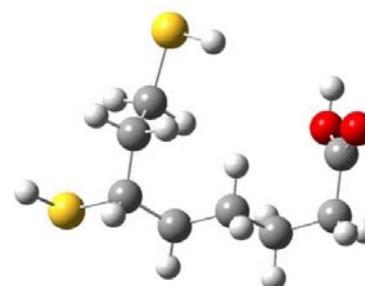
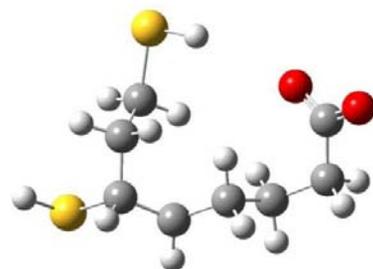
A. AH-C2



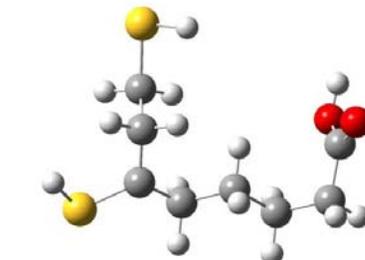
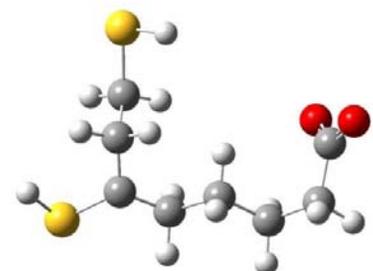
B. AH-C3



C. AH-C4



D. AH-C5



E. AH-C6

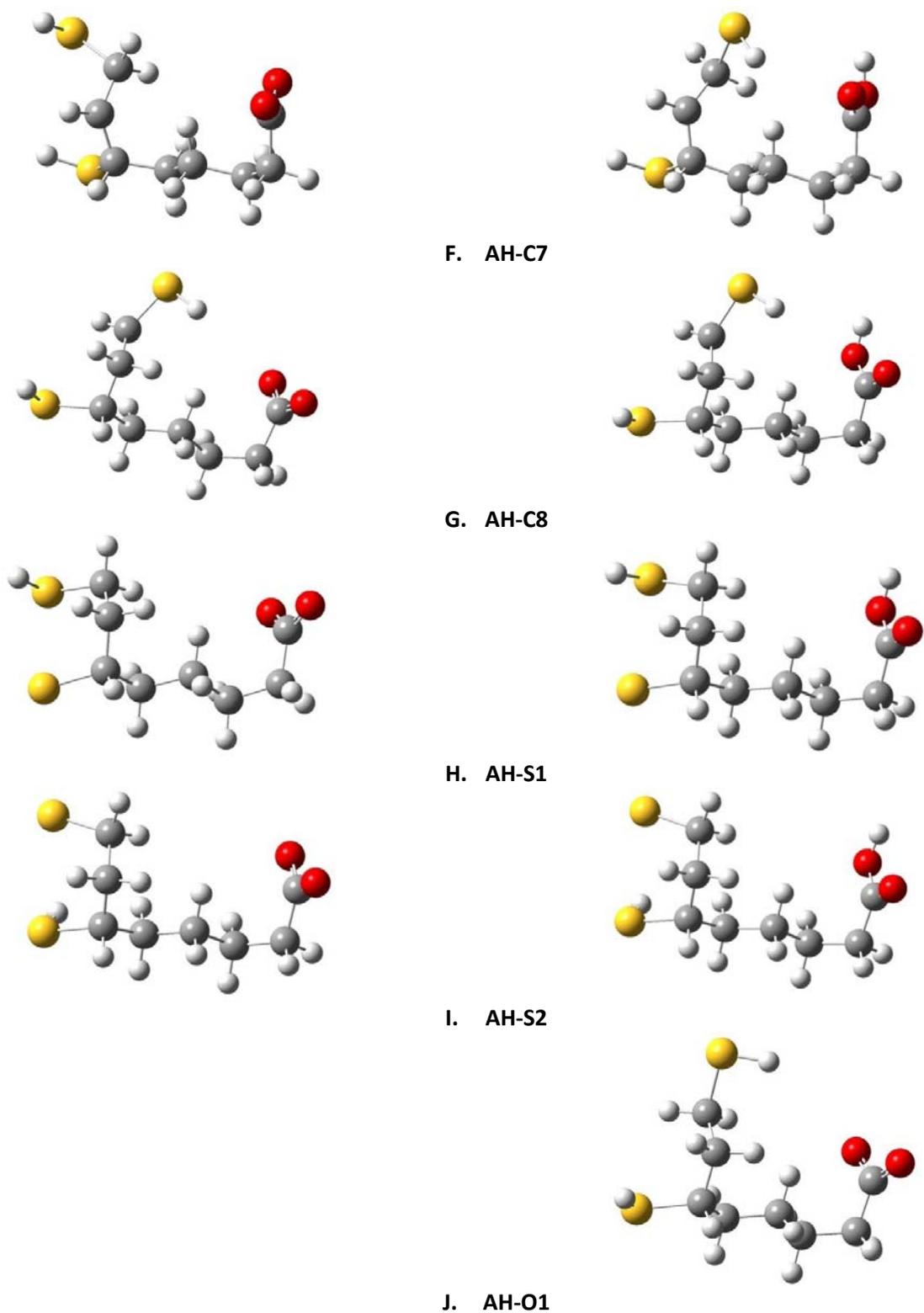


Figura 6.6. Estructuras optimizadas para los productos de la reacción de abstracción de hidrógeno a partir del dihidrolipoato y del ácido dihidrolipoico.

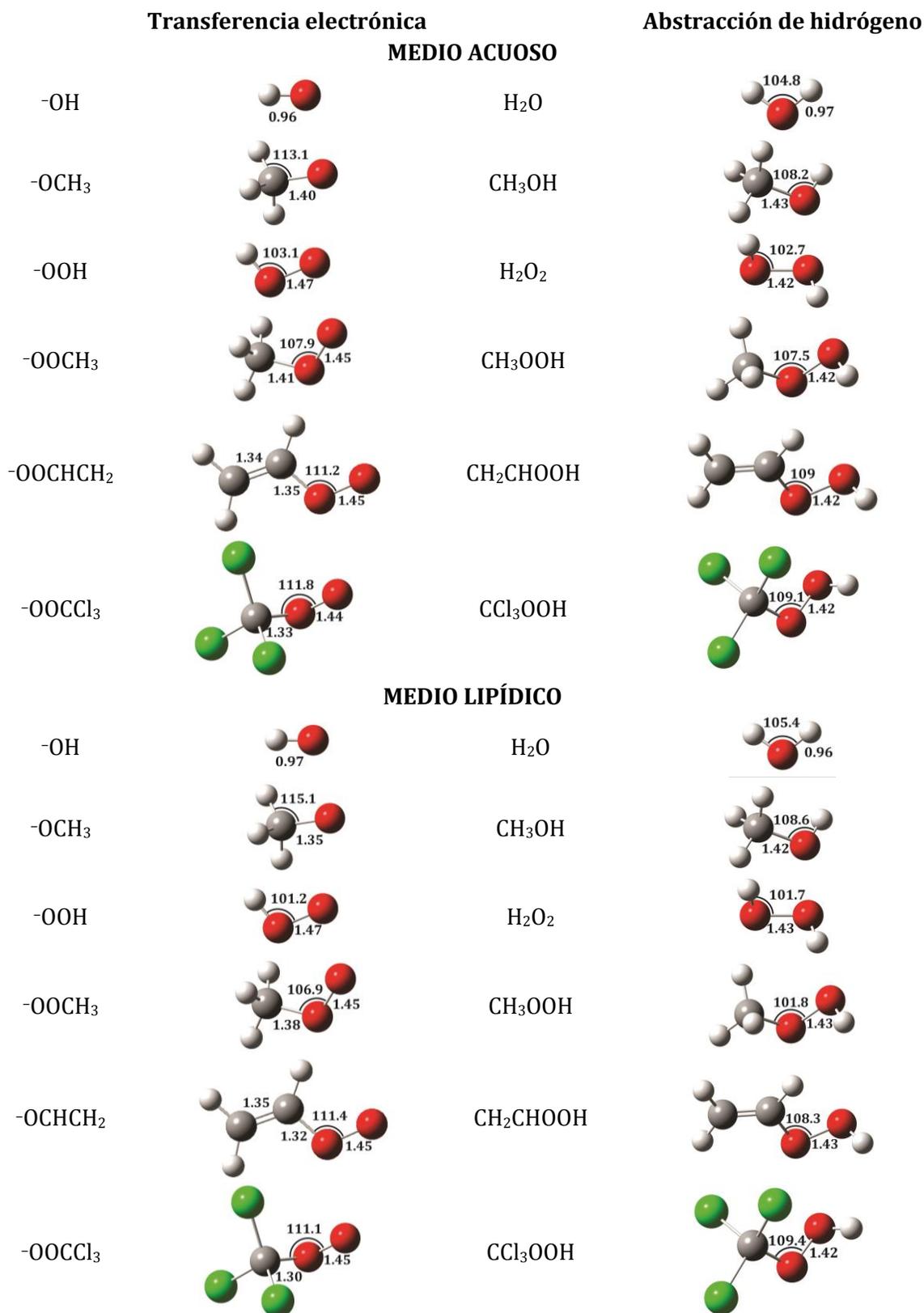


Figura 6.7. Estructuras optimizadas para los productos de la reacciones de abstracción de hidrógeno y transferencia electrónica a partir de los distintos radicales

Estudio termodinámico.

Fase acuosa

La forma en la que comenzamos el análisis de estas reacciones es mediante un estudio termodinámico, calculando los valores de ΔG^0 (Energía libre de Gibbs de productos – Energía libre de Gibbs de reactivos) para todas las reacciones propuestas con el objetivo de determinar las favorecidas termodinámicamente, en otras palabras aquellas reacciones exergónicas.

En las siguientes tablas (6.1 y 6.2) se presentan los valores del ΔG^0 tanto para las reacciones del lipoato como para las del dihidrolipoato, ambos en fase acuosa. Estos valores se presentan para el mecanismo de transferencia electrónica (TE), así como también para el mecanismo de abstracción de hidrógeno (AH) de todos los sitios posibles de estos dos compuestos.

Tabla 6.1. ΔG^0 para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en el lipoato con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OCCl}_3$
TE	-6.1	5.0	17.9	26.0	20.0	-3.5
AH-C2	-28.1	-12.8	4.1	5.8	4.5	-3.6
AH-C3	-23.9	-8.7	8.2	9.9	8.6	0.5
AH-C4	-23.6	-8.4	8.5	10.2	8.9	0.8
AH-C5	-24.3	-9.0	7.8	9.5	8.2	0.1
AH-C6	-29.0	-13.7	3.1	4.9	3.6	-4.6
AH-C7	-24.8	-9.6	7.3	9.0	7.7	-0.4
AH-C8	-27.4	-12.1	4.8	6.5	5.1	-3.0

Tabla 6.2. ΔG^0 para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en el dihidrolipoato con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OCCl}_3$
TE	19.1	30.0	43.0	51.2	45.2	28.7
AH-C2	-27.9	-12.6	4.3	6.0	4.7	-3.4
AH-C3	-24.3	-9.0	7.8	9.5	8.2	0.1
AH-C4	-25.4	-10.2	6.7	8.4	7.1	-1.0
AH-C5	-23.3	-8.0	8.9	10.6	9.3	1.1
AH-C6	-29.1	-13.8	3.1	4.8	3.5	-4.7
AH-C7	-26.3	-11.0	5.9	7.6	6.3	-1.8
AH-C8	-26.8	-11.5	5.4	7.1	5.8	-2.3
AH-S1	-37.8	-22.6	-5.7	-4.0	-5.3	-13.4
AH-S2	-37.2	-21.9	-5.1	-3.4	-4.7	-12.8

En las tablas 6.1 y 6.2 están sombreadas aquellas reacciones favorecidas termodinámicamente, es decir, los productos formados tienen energía libre de Gibbs menor a la de los reactivos. Para estas reacciones optimizamos la geometría del estado de transición correspondiente y, a partir de éste, su constante de velocidad asociada, estos resultados se mostrarán más adelante en el estudio cinético.

En cuanto al mecanismo de transferencia electrónica, las reacciones del lipoato con $\cdot\text{OH}$ y con $\cdot\text{OOCCl}_3$ son las únicas exergónicas. Para el dihidrolipoato, dentro de este mismo mecanismo, la reacción es endergónica con todos los radicales utilizados, es decir, la reacción inversa a la descrita en la reacción 6.4 será la favorecida en estas condiciones.

En ambas tablas vemos que, para los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ todas las posibles abstracciones de hidrógeno son termodinámicamente favorables, tanto para el lipoato como para el dihidrolipoato.

Esta situación cambia con los radicales alquilperoxilo, el único enlace que es lo suficientemente débil para ser roto por estos radicales es el S-H. El enlace H-OO en HOOR es mucho más débil que el enlace H-O en la molécula H_2O y no es lo suficientemente fuerte para favorecer la ruptura de un enlace C-H. Por tanto, las únicas reacciones exergónicas con los radicales $\cdot\text{OOH}$ y $\cdot\text{OOCH}_3$ son las abstracciones de hidrógeno de los grupos tiol.

Es notable que las abstracciones de los hidrógenos unidos a los azufres, en el dihidrolipoato, son exergónicas con todos los radicales, aunque las mayores diferencias se observan para los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ y $\cdot\text{OOCCl}_3$. Para este último radical además son favorecidas termodinámicamente aquellas abstracciones de los hidrógenos unidos a los carbonos α a los azufres (C6 y C8) y al carbono α al grupo carbonilo (C2). Estas tablas nos permiten, de primera instancia, conocer la alta reactividad del enlace S-H y, aunque era de esperarse, se observa que reacciona incluso con radicales de baja reactividad como el $\cdot\text{OOH}$, $\cdot\text{OOCH}_3$ y $\cdot\text{OOCHCH}_2$.

Fase lipídica.

De la misma forma, hicimos el análisis termodinámico para el ácido lipoico y para el ácido dihidrolipoico pero ahora en fase lipídica. Para simular este medio utilizamos pentiletanoato como disolvente. Los resultados de ΔG^0 para los mecanismos de TE y AH en el ácido lipoico y en el ácido dihidrolipoico, bajo estas condiciones, se presentan en la tabla 6.3 y 6.4, respectivamente.

Tabla 6.3. ΔG^0 para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en el ácido lipoico con seis diferentes radicales. Disolvente = Pentiletanoato.

	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OCH}_3$	$\text{HOO}\bullet$	$\bullet\text{OOCH}_3$	$\bullet\text{OOCHCH}_2$	$\bullet\text{OOCCL}_3$
TE	49.4	59.8	69.5	70.1	58.7	37.0
AH-C2	-24.3	-9.1	8.1	10.2	9.0	1.6
AH-C3	-19.9	-4.6	12.6	14.7	13.5	6.0
AH-C4	-20.4	-5.1	12.0	14.1	13.0	5.5
AH-C5	-22.1	-6.8	10.3	12.4	11.3	3.8
AH-C6	-25.6	-10.4	6.8	8.9	7.7	0.3
AH-C7	-21.2	-5.9	11.2	13.3	12.2	4.7
AH-C8	-24.3	-9.0	8.2	10.3	9.1	1.6
AH-O	6.4	21.7	38.8	40.9	39.7	32.3

Tabla 6.4. ΔG^0 para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en el ácido dihidrolipoico con seis diferentes radicales. Disolvente = Pentiletanoato.

	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OCH}_3$	$\text{HOO}\bullet$	$\bullet\text{OOCH}_3$	$\bullet\text{OOCHCH}_2$	$\bullet\text{OOCCL}_3$
TE	73.5	83.9	93.6	94.2	82.8	61.1
AH-C2	-25.4	-10.1	7.0	9.2	8.0	0.5
AH-C3	-19.6	-4.3	12.9	15.0	13.8	6.3
AH-C4	-21.7	-6.4	10.7	12.8	11.7	4.2
AH-C5	-21.8	-6.5	10.6	12.7	11.6	4.1
AH-C6	-25.1	-9.9	7.3	9.4	8.2	0.8
AH-C7	-21.7	-6.4	10.8	12.9	11.7	4.2
AH-C8	-23.4	-8.1	9.0	11.1	10.0	2.5
AH-S1	-35.3	-20.0	-2.8	-0.7	-1.9	-9.4
AH-S2	-33.7	-18.4	-1.3	0.8	-0.4	-7.8
AH-O	-5.9	9.4	26.5	28.6	27.5	20.0

Las diferencias de los valores de ΔG^0 entre medio acuoso y medio lipídico no son muy grandes. Sin embargo, las reacciones en agua son sistemáticamente más exergónicas por 1–6 kcal/mol que en pentiletanoato. Estas diferencias son mayores para las reacciones con el radical $\bullet\text{OOCCL}_3$.

Como se esperaba, los resultados obtenidos dentro del estudio para el mecanismo de TE muestran ΔG^0 mayores a 37 kcal/mol para el ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico, con todos los radicales, debido a que los productos aniónicos no se estabilizan en solventes no polares. Estos valores tan altos en el ΔG^0 nos permiten establecer que todas las reacciones son endergónicas y que se efectuarán con constantes de velocidad muy pequeñas y, por tanto, no tendrán un peso significativo en la constante de velocidad global. Por tal motivo no se incluirán en el análisis cinético para estos compuestos.

En cuanto al mecanismo de AH se observa un comportamiento similar al obtenido en el lipoato y en el dihidrolipoato donde todas las abstracciones son termodinámicamente favorables con los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$. Además, las abstracciones de los hidrógenos unidos a los átomos de azufre presentan un carácter exérgico con todos los radicales. En cuanto a la abstracción de hidrógeno del grupo carboxilo, encontramos que únicamente en el ácido dihidrolipoico y con el radical hidroxilo es ligeramente exérgica, bajo estas condiciones.

Estudio cinético.

Fase acuosa.

Para todas aquellas reacciones de abstracción de hidrógeno exérgicas, como se había mencionado, se determinaron las estructuras de los estados de transición correspondientes para cada hidrógeno, con la intención de determinar las diferencias entre la energía de éstos y los reactivos, antioxidante + radical (energía de activación, ΔG^\ddagger) y, con ésta, calcular el valor en su constante de velocidad.

En las tablas 6.1–6.4 podemos ver que las reacciones de abstracción de hidrógeno con el $\cdot\text{OH}$ son las más exérgicas. Este radical es muy reactivo, esto se debe, principalmente, a que el enlace O–H en la molécula de agua es muy fuerte. Por esta razón, el $\cdot\text{OH}$ será poco selectivo en las reacciones de abstracción de hidrógeno, además, se espera que sus constantes de velocidad sean de una magnitud similar y controladas por difusión, como se ha reportado que ocurre con otras moléculas antioxidantes de estructura similar, como el glutatión.¹²⁰ Por tanto, los valores para las ΔG^\ddagger y las constantes de velocidad para las reacciones de abstracción de hidrógeno con el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) no se calcularon.

Las estructuras de los estados de transición para las abstracciones de los diferentes hidrógenos en el lipoato se muestran en las figuras 6.8 y 6.9. Mientras que los estados de transición para las reacciones de abstracción de hidrógeno en el dihidrolipoato están en las figuras 6.10-6.14.

Los valores para la energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) y las constantes de velocidad (k) que corresponden a las reacciones exérgicas en la abstracción de hidrógeno y transferencia electrónica en el lipoato y en el dihidrolipoato se encuentran en las tablas 6.5 y 6.6, respectivamente.

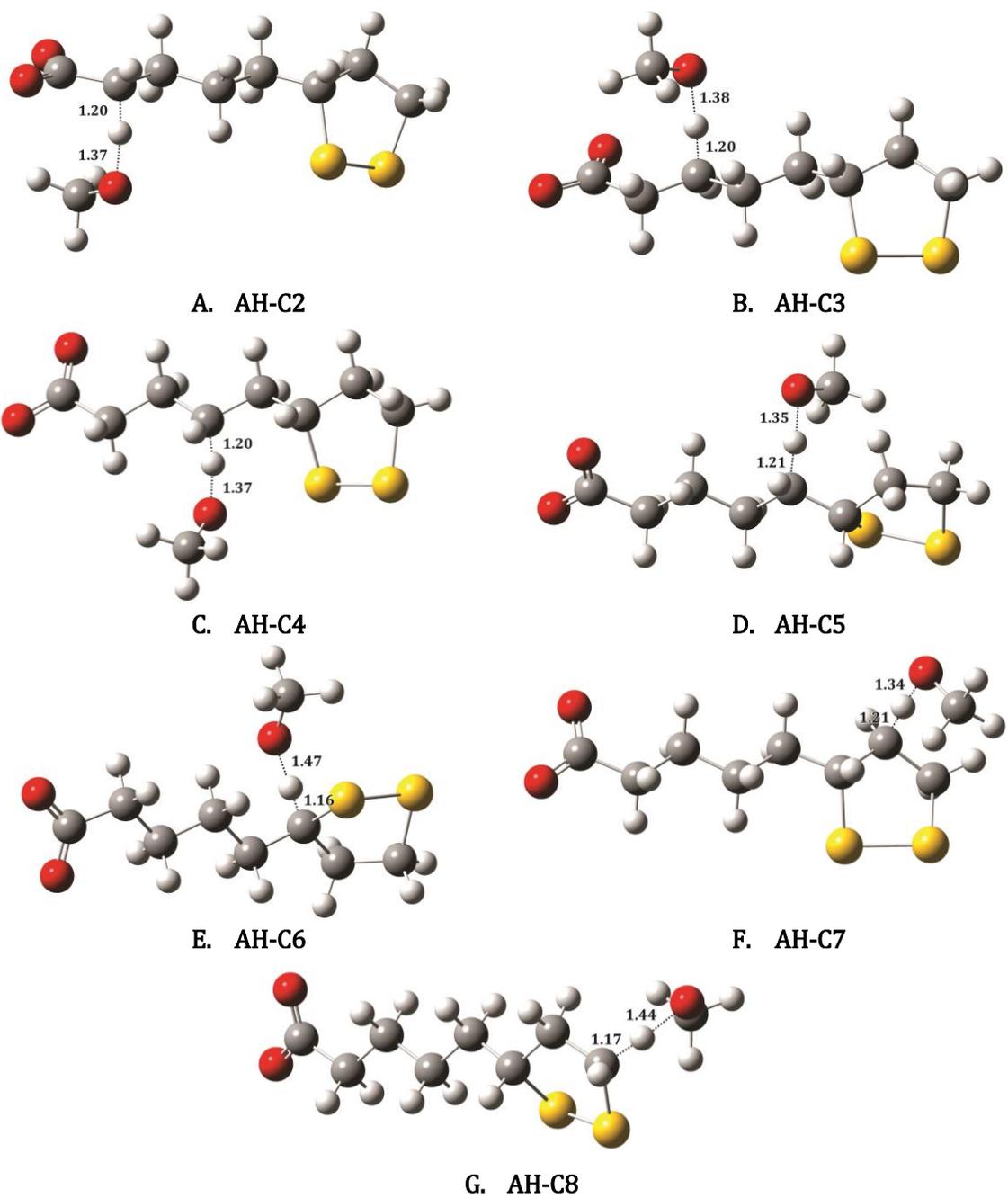


Figura 6.8. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del lipoato con el radical $\cdot\text{OCH}_3$.

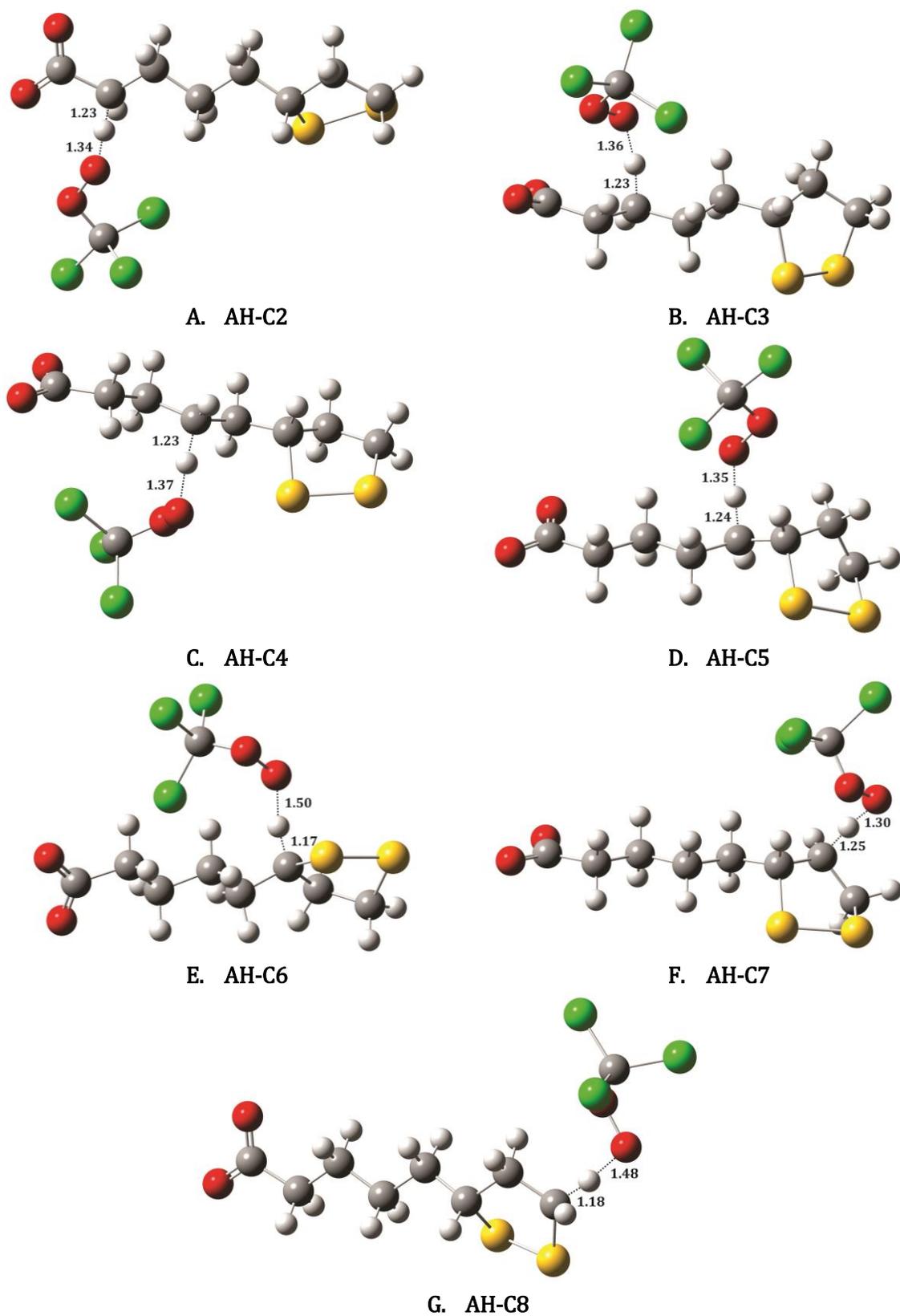
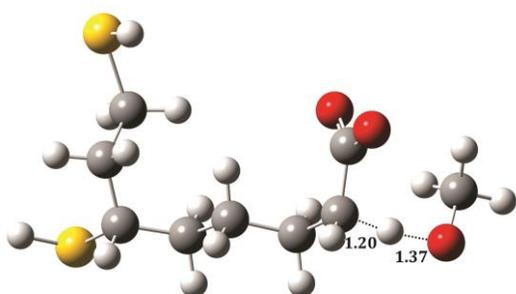


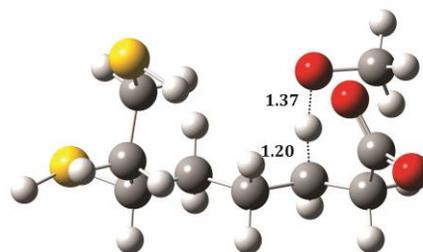
Figura 6.9. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del lipoato con el radical $\cdot\text{OCCl}_3$.

Tabla 6.5. Constantes de velocidad (k) y energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) para la abstracción de hidrógeno (AH) y para la transferencia electrónica (TE) en el lipoato con los radicales $\cdot\text{OCH}_3$ y $\cdot\text{OOCCH}_3$. Disolvente = agua.

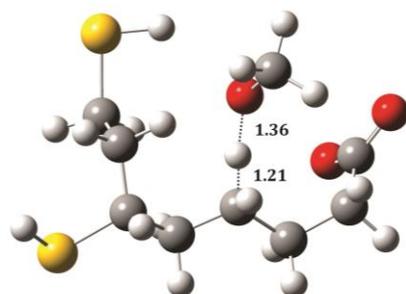
	$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOCCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	$k(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	$k(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
TE	-	5.4×10^6	-	2.2×10^8
AH-C2	9.2	8.2×10^6	12.6	4.6×10^4
AH-C3	8.3	2.6×10^7	11.1	2.0×10^5
AH-C4	10.6	7.4×10^5	14.9	5.7×10^2
AH-C5	11.9	1.2×10^5	12.7	2.4×10^4
AH-C6	7.9	1.1×10^7	9.1	2.9×10^6
AH-C7	12.0	1.2×10^5	13.2	1.7×10^4
AH-C8	8.5	6.9×10^6	8.8	4.6×10^6
total	-	5.86×10^7	-	2.26×10^8
Total(exp)				1.8×10^8 ⁽¹²¹⁾



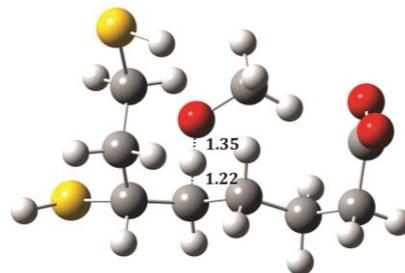
A. AH-C2



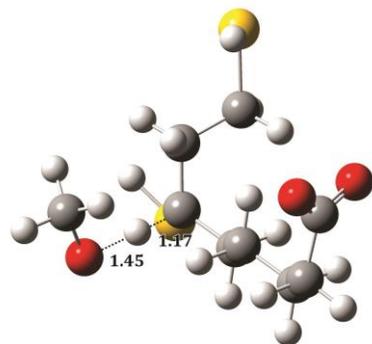
B. AH-C3



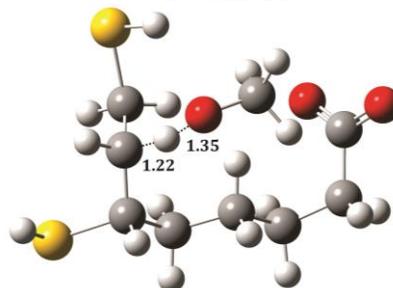
C. AH-C4



D. AH-C5



E. AH-C6



F. AH-C7

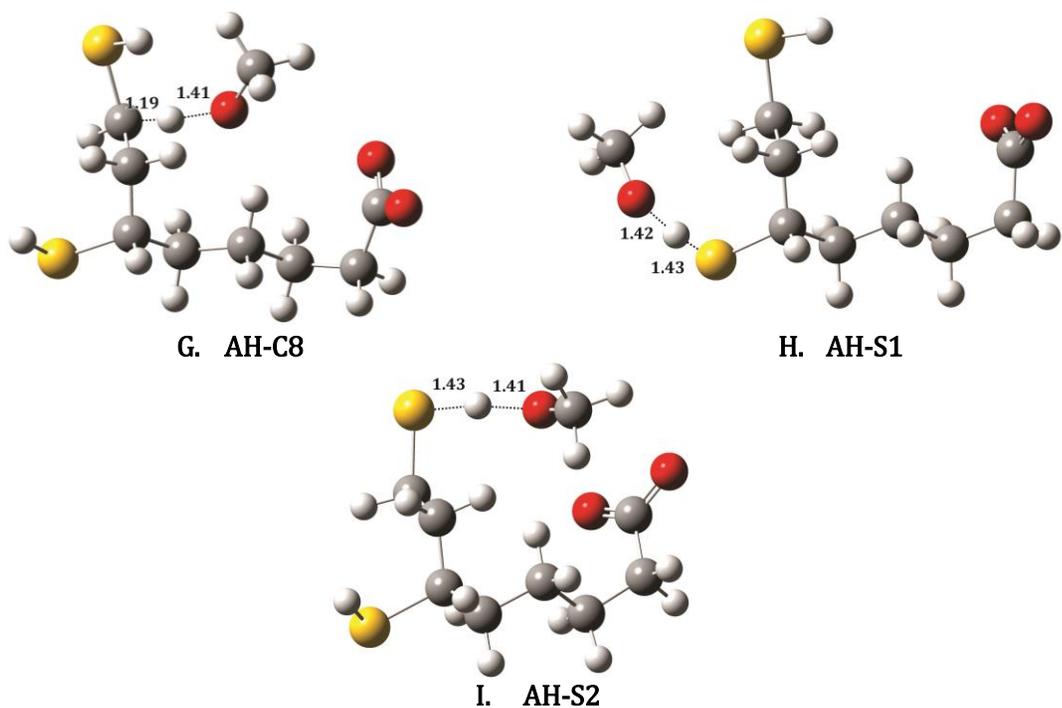


Figura 6.10. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del dihidrolipoato con el radical $\cdot\text{OCH}_3$.

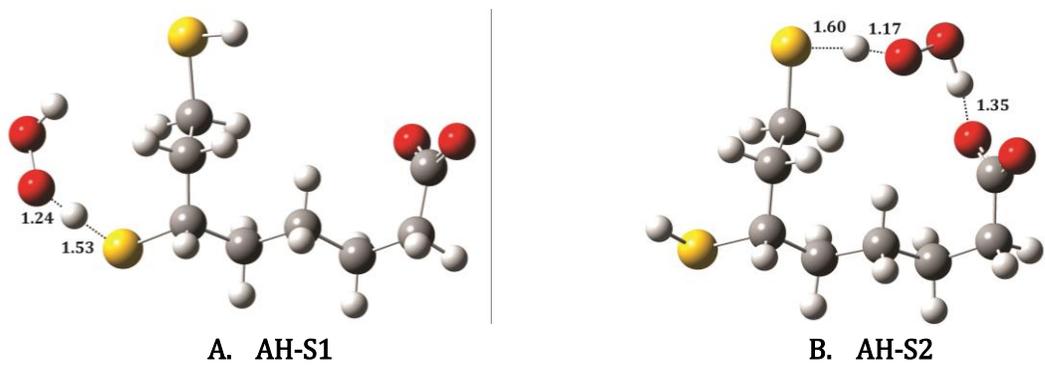


Figura 6.11. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del dihidrolipoato con el radical $\cdot\text{OOH}$.

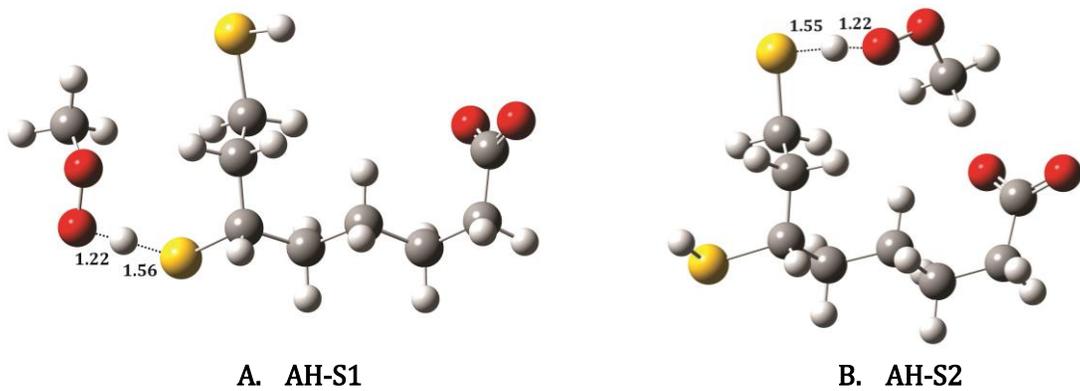
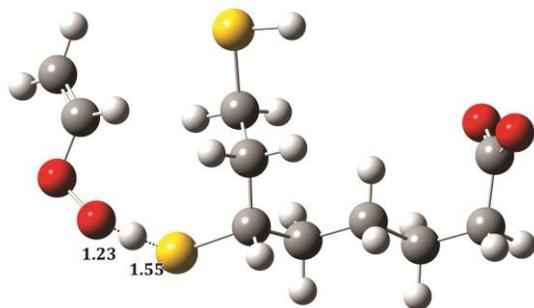
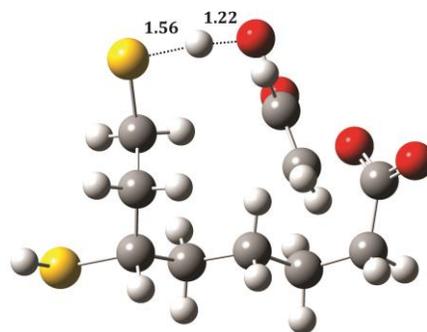


Figura 6.12. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del dihidrolipoato con el radical $\cdot\text{OOCH}_3$.

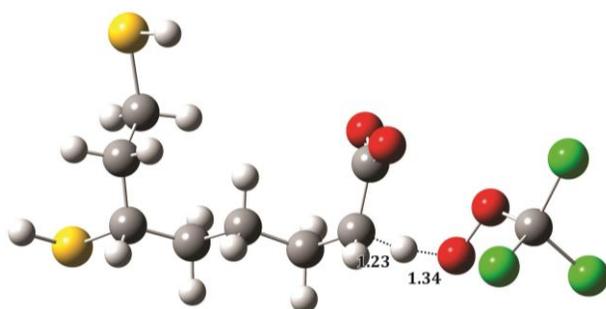


A. AH-S1

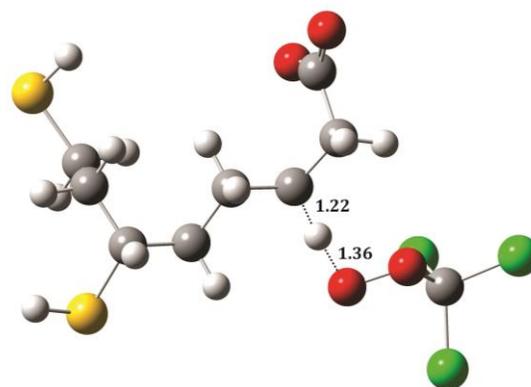


B. AH-S2

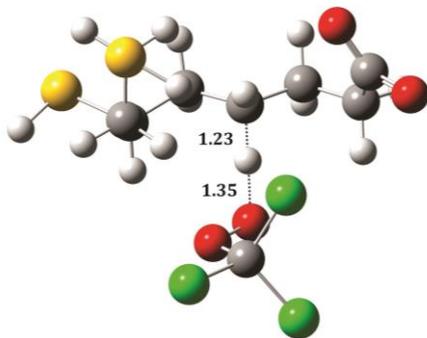
Figura 6.13. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del dihidrolipoato con el radical $\cdot\text{OOCHCH}_2$.



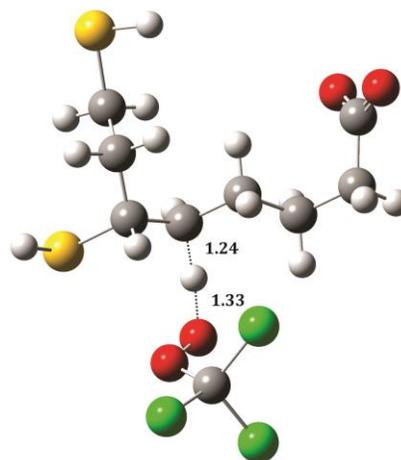
A. AH-C2



B. AH-C3



C. AH-C4



D. AH-C5

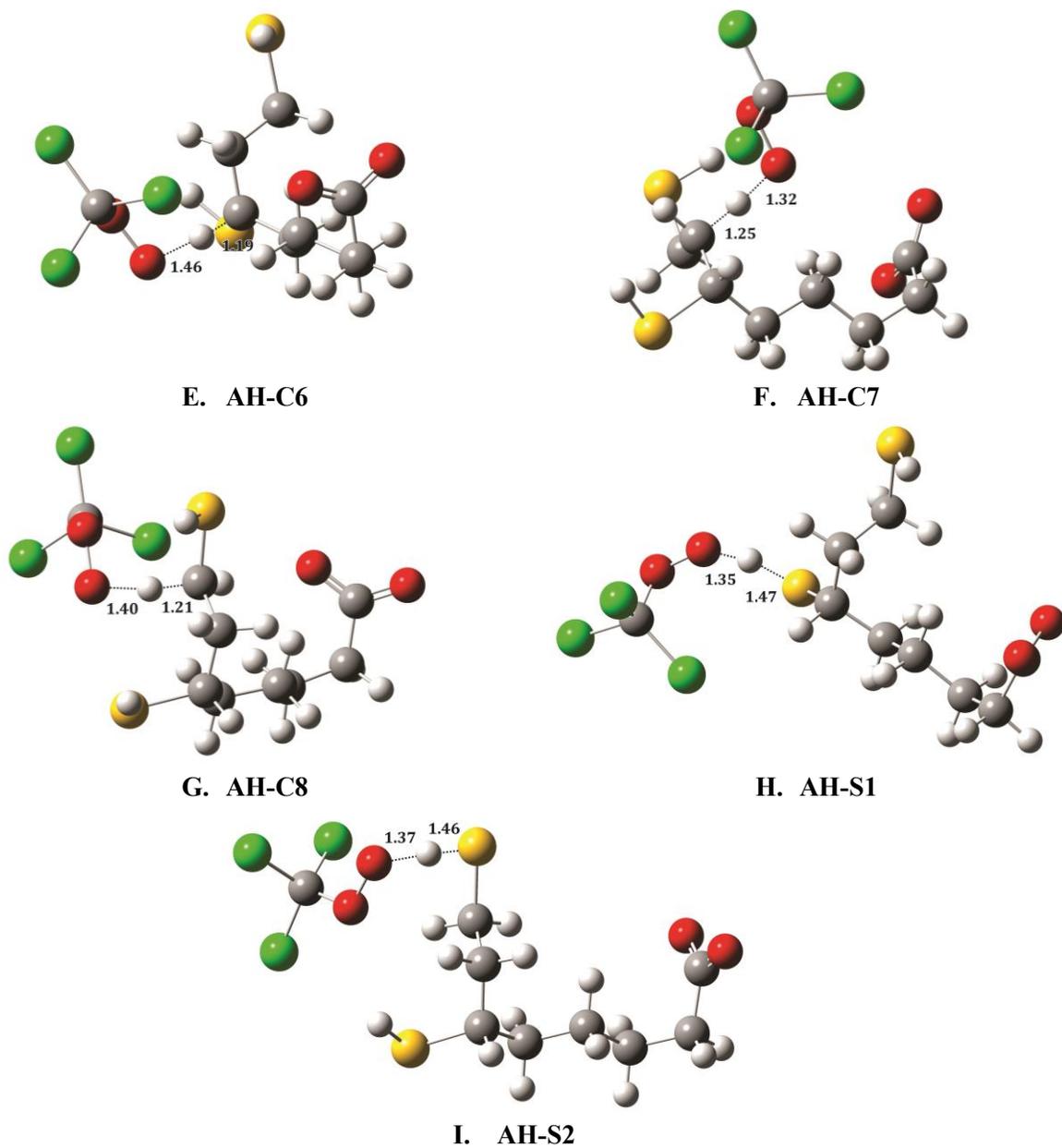


Figura 6.14. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del dihidrolipoato con el radical $\cdot\text{OOC}\text{Cl}_3$.

Tabla 6.6. Constantes de velocidad (k) y energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) para la abstracción de hidrógeno (AH) en el dihidrolipoato con cinco diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOH}$		$\cdot\text{OOCH}_3$		$\cdot\text{OOCHCH}_2$		$\cdot\text{OOCCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)								
AH-C2	9.5	5.6×10^6	---	---	---	---	---	---	13.0	2.3×10^4
AH-C3	10.4	8.8×10^5	---	---	---	---	---	---	10.6	6.2×10^5
AH-C4	11.0	3.9×10^5	---	---	---	---	---	---	12.2	4.7×10^4
AH-C5	11.7	1.7×10^5	---	---	---	---	---	---	12.5	3.9×10^4
AH-C6	8.6	5.4×10^6	---	---	---	---	---	---	10.0	8.9×10^5
AH-C7	10.6	1.2×10^6	---	---	---	---	---	---	12.7	3.4×10^4
AH-C8	9.4	2.0×10^6	---	---	---	---	---	---	10.8	2.0×10^5
AH-S1	7.3	6.1×10^7	16.2	9.0×10^2	15.7	2.0×10^3	13.2	6.1×10^4	12.4	2.1×10^5
AH-S2	6.9	5.1×10^7	6.4	1.3×10^8	13.4	4.0×10^4	13.0	3.6×10^4	11.8	2.6×10^5
Total	-	1.3×10^8	-	1.3×10^8	-	4.2×10^4	-	9.7×10^4	-	2.3×10^6
Total(exp)				$1.32 \times 10^{8(b)}$						$2.7 \times 10^{7(121)}$

^b Suponiendo que la constante de velocidad del $\text{O}_2^{\cdot-}$ es debido a su ácido conjugado ($\cdot\text{OOH}$) con una fracción molar de 0.0025 a pH 7.4.¹³⁸

Las comparaciones entre lipoato y dihidrolipoato revelan que este último es mucho más reactivo. La tendencia observada en la ΔG^\ddagger hace evidente que los grupos SH son los responsables de la mayor capacidad antioxidante en el dihidrolipoato, estas barreras son menores en casi todos los casos. También se observa que, incluso para un radical poco selectivo como lo es el $\cdot\text{OCH}_3$ la barrera energética para el sitio SH (S2) en el dihidrolipoato es 1 kcal/mol menor que el valor más bajo de ΔG^\ddagger para el lipoato. De todos los canales de reacción estudiados solo las reacciones de abstracción de hidrógeno de los grupos tiol son las responsables de la actividad antioxidante del par lipoato/dihidrolipoato. Sólo en el caso del $\cdot\text{OCCl}_3$, las reacciones de abstracción en C3, C6 y C8 compiten con las reacciones de abstracción de hidrógeno de los grupos tiol.

Al comparar los resultados para las constantes de velocidad de las reacciones de abstracción de hidrógeno del lipoato (tabla 6.5) por el radical metoxilo encontramos que los mayores valores son para los hidrógenos de los carbonos α y β al grupo carboxilo (C2 y C3) y los hidrógenos de los carbonos α a los átomos de azufre (C6 y C8). Mientras que para las reacciones de abstracción de hidrógeno del dihidrolipoato (tabla 6.6) con el mismo radical, estos canales de abstracción también son importantes, pero sobretodo los son las abstracciones de los hidrógenos de los grupos tiol (S1 y S2), los cuales tienen los valores más altos en sus constantes de velocidad.

Es importante mencionar que los radicales $\cdot\text{OCCl}_3$ y $\cdot\text{OCH}_3$ pueden reaccionar con velocidades similares con moléculas biológicas estructuralmente equivalentes. Se considera que un buen antioxidante es aquel que reacciona más rápido con moléculas oxidantes que moléculas como proteínas o ADN. Este no es el caso de lipoato con la mayoría de los radicales utilizados en el estudio.

Si comparamos únicamente los valores de las constantes de velocidad para las abstracciones de los hidrógenos de los dos grupos tiol en el dihidrolipoato, vemos que la mayor diferencia es para aquellas efectuadas con el radical $\cdot\text{OOH}$. La abstracción de hidrógeno del tiol terminal (S2) ocurre casi 10^5 veces más rápido que la abstracción de hidrógeno del tiol unido a C6 (S1), y es más rápida que cualquiera de las abstracciones de hidrógeno en el lipoato. La explicación a esta diferencia puede estar en la estructura del estado de transición correspondiente a esta reacción (AH-S2, figura 6.11). En agua, el grupo carboxilo desprotonado del dihidrolipoato y el hidrógeno electro deficiente del radical $\cdot\text{OOH}$ forman un enlace de hidrógeno muy fuerte. Resulta en un ΔG^\ddagger mucho menor que el que se espera teniendo solamente en cuenta la energía de disociación del enlace S-H y la energía de formación del enlace H-OOH. Aunque el dihidrolipoato tiene dos grupos S-H, sólo uno de ellos puede tener la conformación apropiada para la formación del enlace de hidrógeno. El otro grupo tiol puede usarse para notar la magnitud de este efecto, mostrada en la tabla 6.6, el estado de transición de la abstracción de hidrógeno en S2 es aproximadamente 10 kcal/mol más estable que la abstracción de hidrógeno en S1. Este fenómeno no ocurre en medio lipídico donde el grupo carboxilo se encuentra protonado.

Para analizar la importancia relativa de los diferentes canales de abstracción de hidrógeno, en las tablas 6.7 y 6.8 se presentan los porcentajes correspondientes a la abstracción de cada hidrógeno, obtenidos a partir de los valores de las constantes de velocidad mediante la siguiente fórmula:

$$\%_i = \frac{k_i}{k_{total}} \quad (6.11)$$

Con estas tablas podemos ver con mayor facilidad que los valores mayores son para las abstracciones de los grupos tiol del dihidrolipoato.

**Tabla 6.7. Porcentajes para las abstracciones de hidrógeno (AH) en el lipoato con los radicales $\cdot\text{OCH}_3$ y $\cdot\text{OOCCH}_3$.
Disolvente = agua.**

	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCCH}_3$
AH-C2	15.5	0.6
AH-C3	48.2	2.5
AH-C4	1.4	0.0
AH-C5	0.2	0.3
AH-C6	21.5	37.7
AH-C7	0.2	0.2
AH-C8	13	58.7

**Tabla 6.8. Porcentajes para las abstracciones de hidrógeno (AH) en el dihidrolipoato con cinco diferentes radicales.
Disolvente = agua.**

	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OOCCH}_3$	$\cdot\text{OOCCH}_2$	$\cdot\text{OOCCH}_3$
AH-C2	4.4	---	---	---	1.0
AH-C3	0.7	---	---	---	26.9
AH-C4	0.3	---	---	---	2.0
AH-C5	0.1	---	---	---	1.7
AH-C6	4.2	---	---	---	38.4
AH-C7	0.9	---	---	---	1.5
AH-C8	1.6	---	---	---	8.4
AH-S1	47.9	0.0	4.7	63.0	9.0
AH-S2	39.9	100.0	95.3	37.0	11.1

Finalmente se calcularon las constantes de velocidad asociadas al mecanismo de transferencia electrónica, tanto para el lipoato como para el dihidrolipoato. Estos valores se muestran en las tablas 6.9 y 6.10, así como los parámetros necesarios para su cálculo.

Tabla 6.9. Valores para λ , ΔG^\ddagger , y constantes de velocidad en el mecanismo de transferencia electrónica entre el lipoato y seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	λ (kcal/mol)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{ap} ($M^{-1} s^{-1}$)
$\cdot OH$	19.93	2.23	1.4×10^{11}	7.80×10^9
$\cdot OOH$	30.10	18.70	1.2×10^{-1}	
$\cdot OCH_3$	26.49	9.10	5.4×10^6	
$\cdot OOCCH_3$	23.01	25.61	1.1×10^{-6}	
$\cdot OOCCHCH_2$	24.80	19.68	2.3×10^{-2}	
$\cdot OOCCL_3$	31.91	6.06	2.2×10^8	

Tabla 6.10. Valores para λ , ΔG^\ddagger , y constantes de velocidad en el mecanismo de transferencia electrónica entre el dihidrolipoato y seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	λ (kcal/mol)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($M^{-1} s^{-1}$)
$\cdot OH$	13.56	18.25	2.58×10^{-1}
$\cdot OOH$	23.73	45.31	3.75×10^{-21}
$\cdot OCH_3$	20.12	30.07	5.62×10^{-10}
$\cdot OOCCH_3$	16.63	66.80	6.61×10^{-37}
$\cdot OOCCHCH_2$	18.43	52.68	1.51×10^{-26}
$\cdot OOCCL_3$	18.43	28.65	6.13×10^{-9}

De todas las reacciones descritas en la Tabla 6.9, sólo la constante de velocidad para la reacción con el radical $\cdot OH$ tiene un valor cercano al límite por difusión, por lo que también se determinó el valor de la constante de velocidad aparente (k_{ap}). Para el $\cdot OH$, el $\cdot OCH_3$ y el $\cdot OOCCL_3$ se obtienen las constantes de velocidad mayores. Mientras que las constantes de velocidad para la transferencia electrónica en el dihidrolipoato son muy pequeñas con todos los radicales, como mencionamos anteriormente, estas reacciones no se llevan a cabo.

Fase lipídica

De la misma forma en la que realizamos el estudio cinético para las reacciones del lipoato y del dihidrolipoato con diferentes radicales, lo hicimos para estos dos antioxidantes, pero en pentiletanoato. Como se mencionó anteriormente, para esta fase sólo se hizo el análisis sobre la reacción de abstracción de hidrógeno debido a que las reacciones de transferencia electrónica son muy endergónicas con todos los radicales utilizados. Los estados de transición completamente optimizados para las abstracciones de hidrógeno en el lipoato con los radicales $\cdot OCH_3$ y $\cdot OOCCL_3$ se presentan en las figuras 6.15 y 6.16, respectivamente. Mientras que los estados de transición para las reacciones de abstracción de hidrógeno con ácido dihidrolipoico con los diversos radicales utilizados están presentes en las figuras 6.17- 6.21.

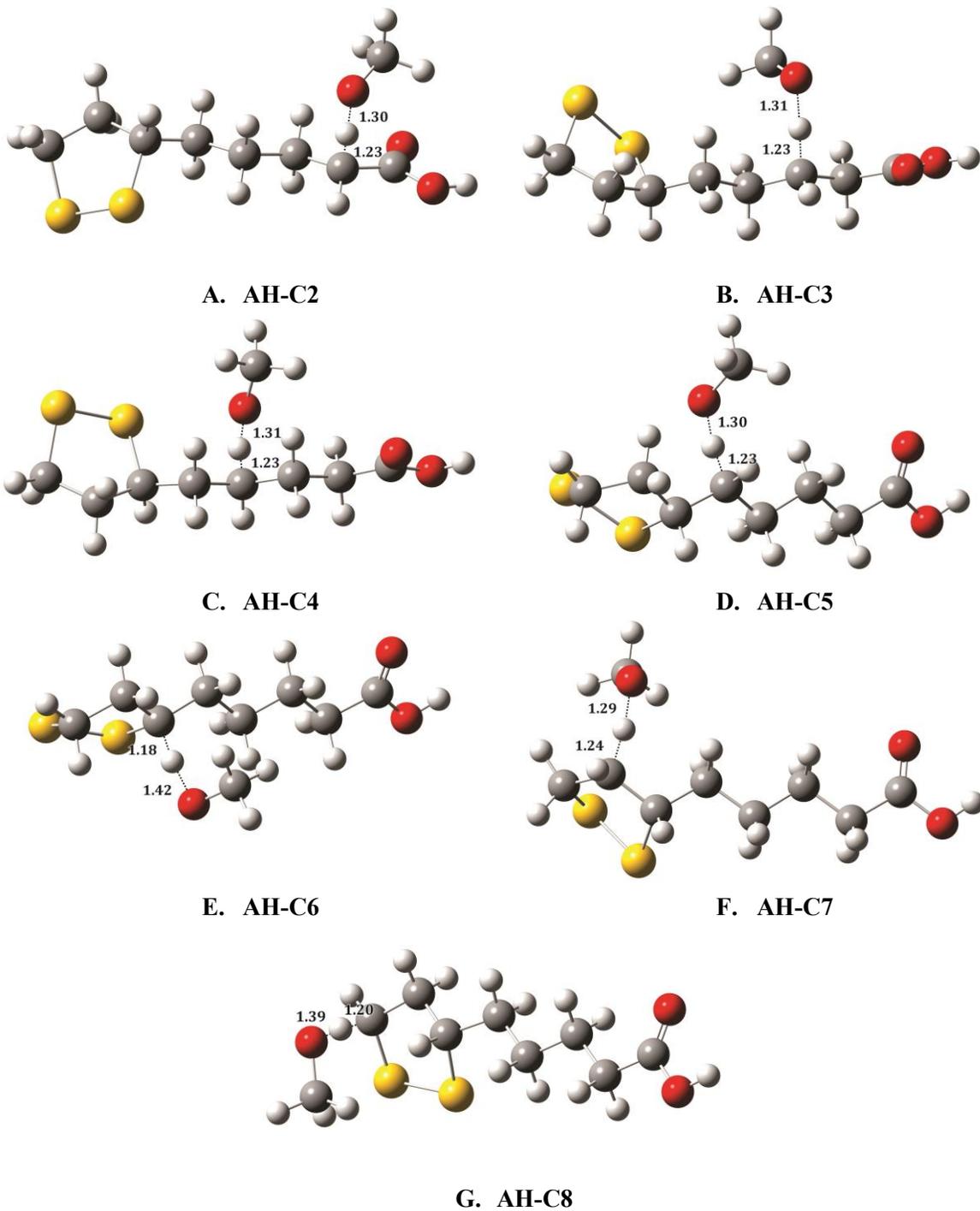
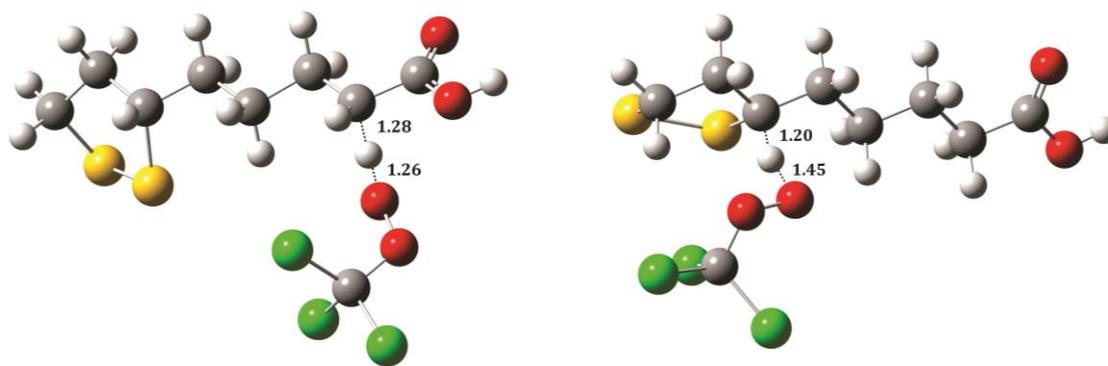
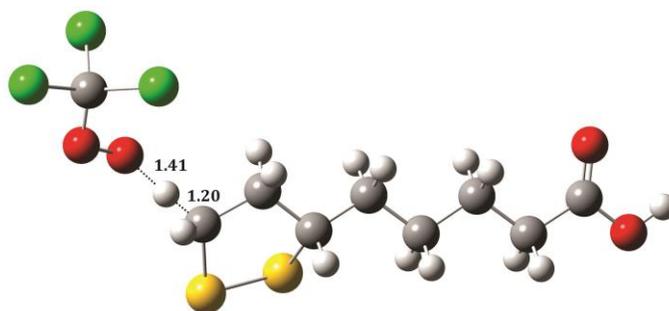


Figura 6.15. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido lipico con el radical $\cdot\text{OCH}_3$.



A. AH-C2

B. AH-C6



C. AH-C8

Figura 6.16. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido lipoico con el radical $\cdot\text{OOC}\text{Cl}_3$.

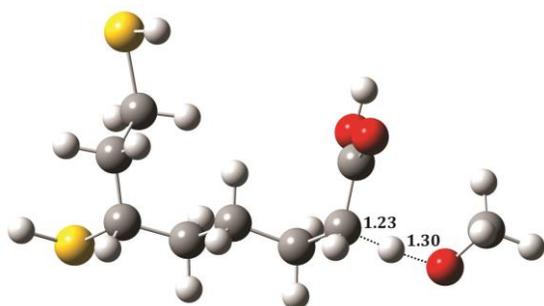
Al igual que para el lipoato, en el ácido lipoico en fase lipídica las abstracciones de hidrógeno con el radical metoxilo que tienen constantes de velocidad mayores, son aquellos que se encuentran unidos a los carbonos α al grupo carbonilo y α a los átomos de azufre (tabla 6.11).

La tabla 6.12 presenta los resultados obtenidos para las reacciones de abstracción de hidrógeno en ácido dihidrolipoico (en fase lipídica). Esta tabla demuestran que las reacciones de abstracción de los hidrógenos unidos a los carbonos α a los átomos de azufre (C6 y C8) son los que tienen las constantes de velocidad mayores además de los hidrógenos de los grupos tiol (S1 y S2). Sin embargo, en el dihidrolipoato se obtuvo que el hidrógeno en S2 es el que con mayor facilidad se abstraía (con constantes de velocidad mayores) con casi todos los radicales, mientras que en el ácido dihidrolipoico esa tendencia se invierte y la posición en S1 tiene una ligera energía libre de activación menor porque S1 está unido a un átomo de carbono terciario.

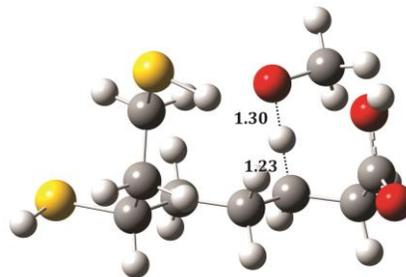
En medio lipídico el grupo carboxilo está protonado y así el enlace de hidrógeno entre el oxígeno de este grupo y el hidrógeno del radical $\cdot\text{OOH}$ (AH-S2, figura 6.18) es mucho más débil y no tiene efecto en la energía libre de activación.

Tabla 6.11. Constantes de velocidad (k) y energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) para la abstracción de hidrógeno (AH) en el ácido lipoico con los radicales $\cdot\text{OCH}_3$ y $\cdot\text{OOCCH}_3$. Disolvente = pentiletanoato.

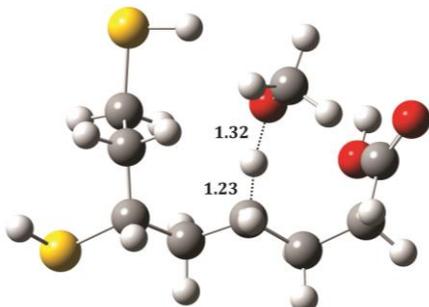
	$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOCCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k(M ⁻¹ s ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k(M ⁻¹ s ⁻¹)
AH-C2	13.7	1.3 x 10 ⁴	20.3	8.8 x 10 ⁻¹
AH-C3	13.0	2.4 x 10 ⁴	-	-
AH-C4	13.9	5.4 x 10 ³	-	-
AH-C5	14.1	4.8 x 10 ³	-	-
AH-C6	10.1	4.8 x 10 ⁵	11.7	2.9 x 10 ⁴
AH-C7	14.6	3.6 x 10 ³	-	-
AH-C8	9.7	1.1 x 10 ⁶	13.3	2.7 x 10 ³
total	-	1.6 x 10 ⁶	-	3.2 x 10 ⁴



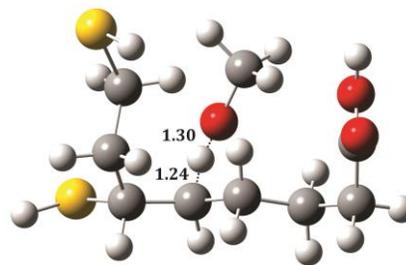
A. AH-C2



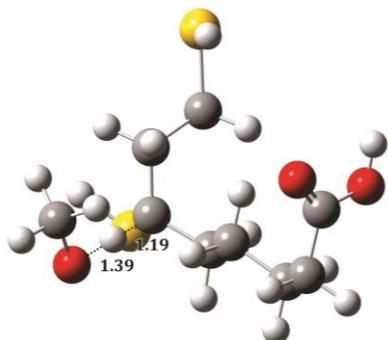
B. AH-C3



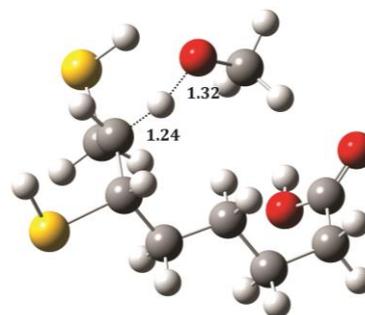
C. AH-C4



D. AH-C5



E. AH-C6



F. AH-C7

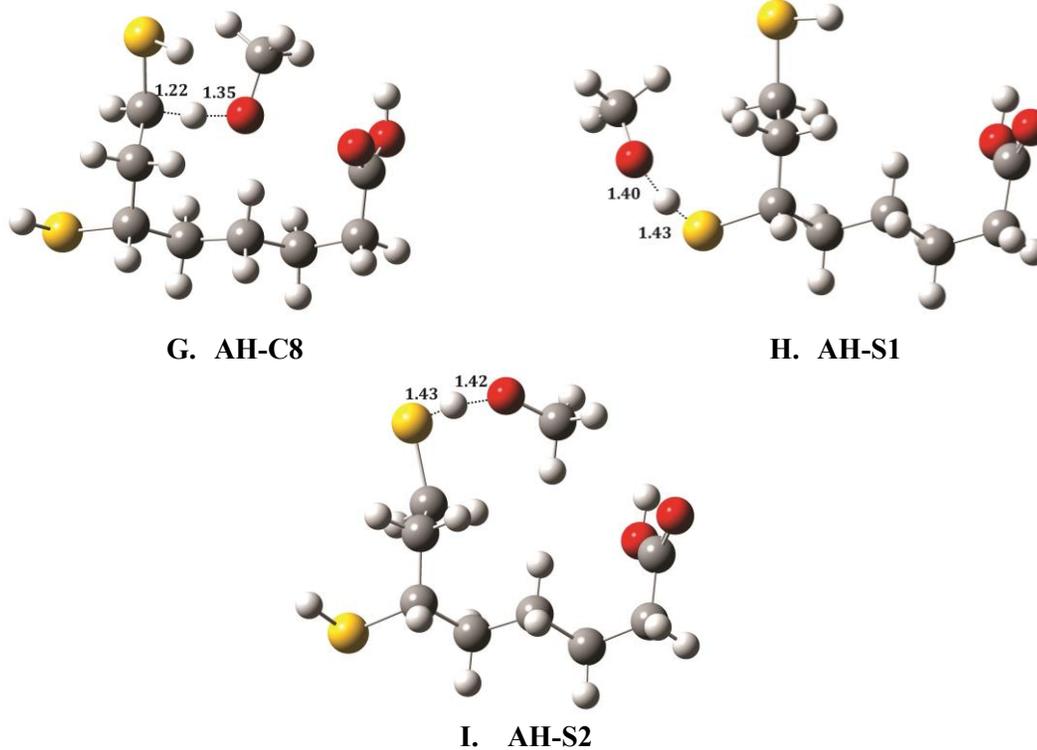


Figura 6.17. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido dihidrolipoico con el radical $\cdot\text{OCH}_3$.

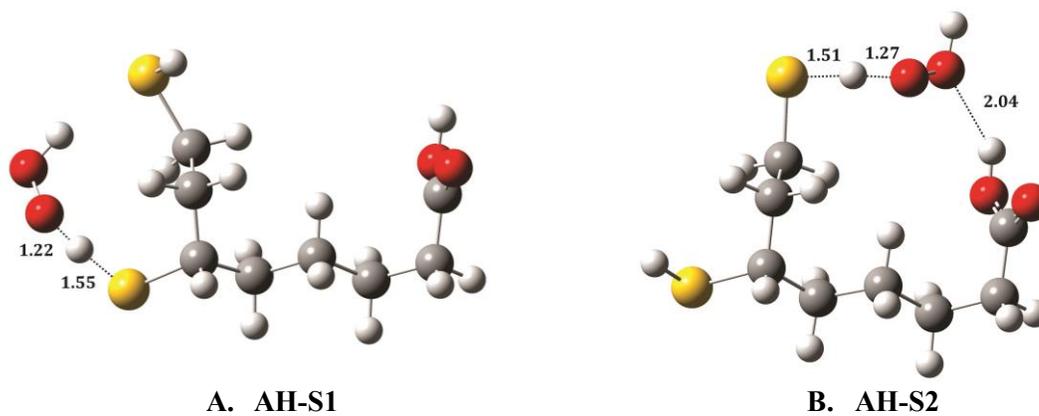


Figura 6.18. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido dihidrolipoico con el radical $\cdot\text{OOH}$.

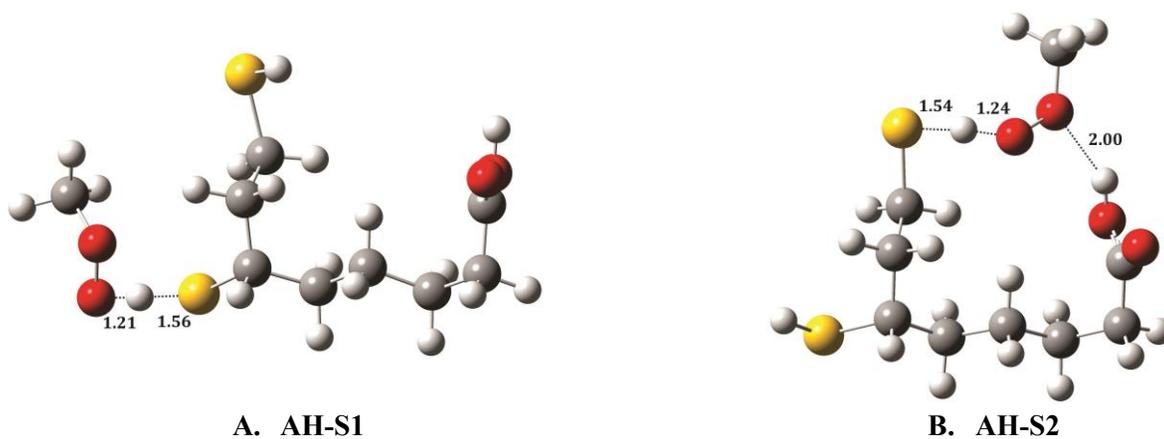


Figura 6.19. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido dihidrolipoico con el radical $\cdot\text{OOCH}_3$.

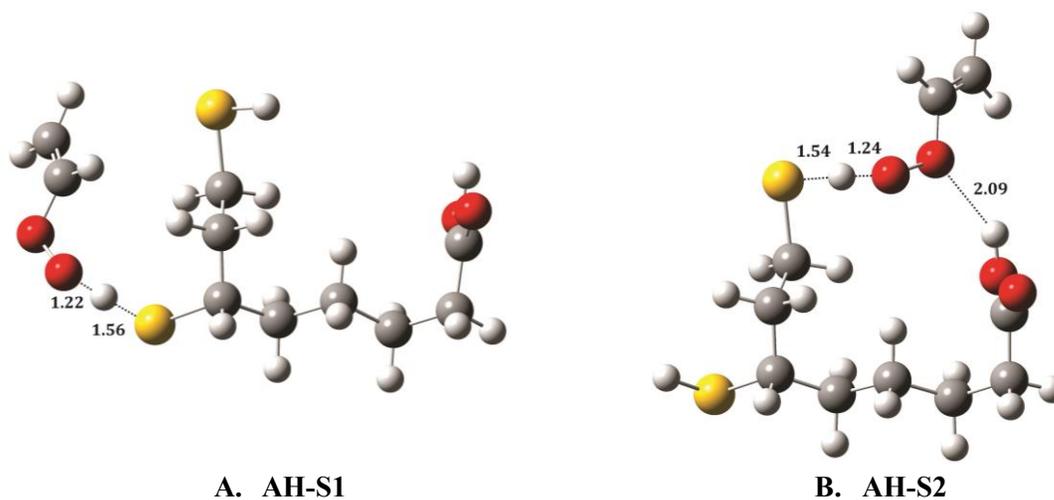
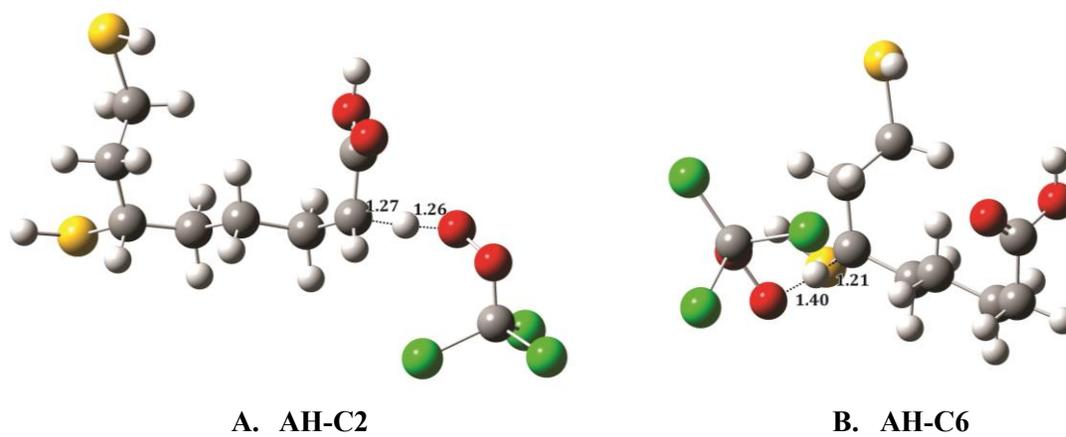


Figura 6.20. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido dihidrolipoico con el radical $\cdot\text{OOCHCH}_2$.



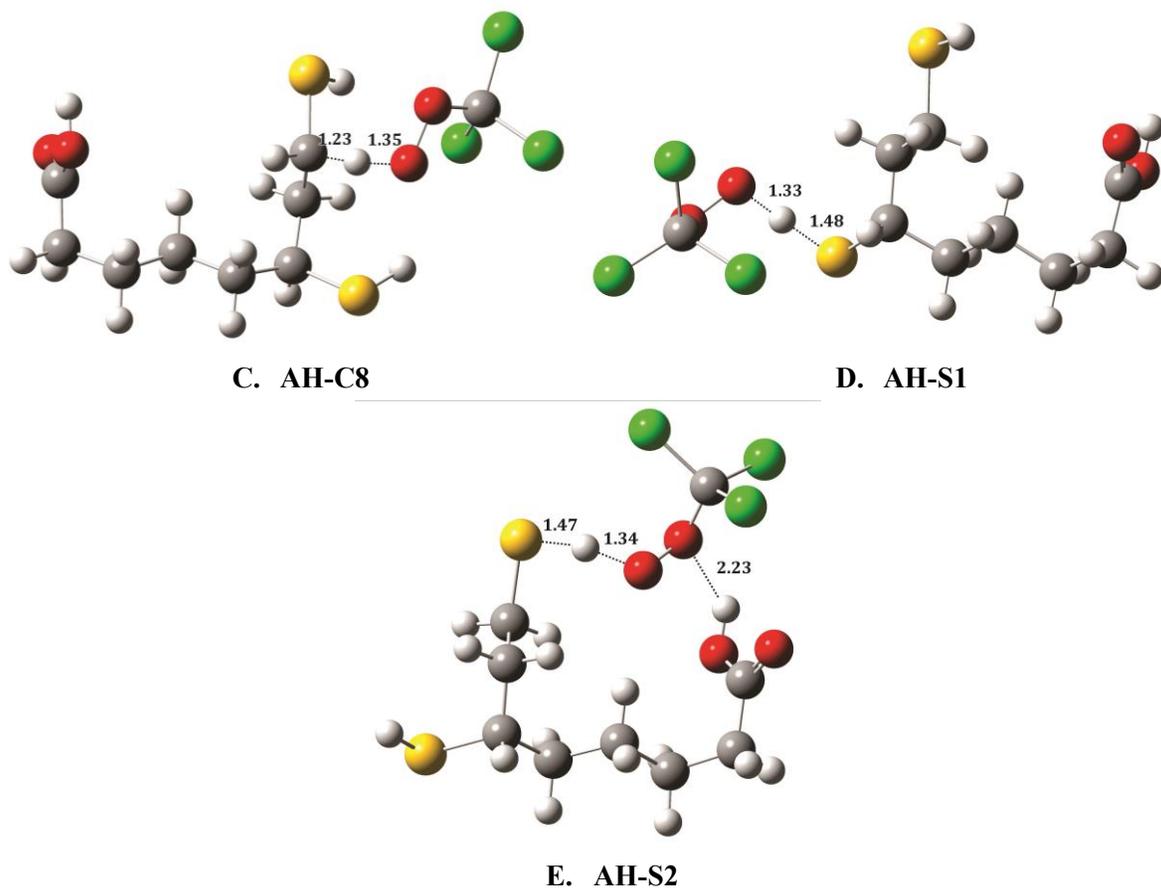


Figura 6. 21. Geometrías para los estados de transición en las reacciones de abstracción de hidrógeno del ácido dihidrolipoico con el radical $\cdot\text{OCCl}_3$.

Tabla 6.12. Constantes de velocidad (k) y energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) para la abstracción de hidrógeno (AH) en el ácido dihidrolipoico con cinco diferentes radicales. Disolvente = pentiletanoato.

	$\cdot\text{OCH}_3$		$\cdot\text{OOH}$		$\cdot\text{OOCH}_3$		$\cdot\text{OOCHCH}_2$		$\cdot\text{OOCCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)								
AH-C2	13.6	1.9×10^4	---	---	---	---	---	---	20.1	1.11
AH-C3	14.4	3.1×10^3	---	---	---	---	---	---	---	---
AH-C4	13.6	6.6×10^3	---	---	---	---	---	---	---	---
AH-C5	14.6	3.1×10^3	---	---	---	---	---	---	---	---
AH-C6	8.9	4.9×10^6	---	---	---	---	---	---	13.6	2.2×10^3
AH-C7	13.8	9.4×10^3	---	---	---	---	---	---	---	---
AH-C8	11.8	5.6×10^4	---	---	---	---	---	---	14.2	8.7×10^2
AH-S1	7.1	7.0×10^7	15.2	2.1×10^3	16.2	4.1×10^2	15.2	1.5×10^3	13.5	2.2×10^4
AH-S2	8.7	3.3×10^6	15.5	9.0×10^2	16.6	1.2×10^2	16.7	1.1×10^2	13.6	9.3×10^3
Total	-	7.8×10^7	-	3×10^3	-	5.3×10^2	-	1.6×10^3	-	3.4×10^4

El porcentaje que le corresponde a cada canal de abstracción de hidrógeno en el ácido lipoico y en el ácido dihidrolipoico lo muestran las tablas 6.13 y 6.14.

**Tabla 6.13. Porcentajes para las abstracciones de hidrógeno (AH) en el ácido lipoico con radicales $\cdot\text{OCH}_3$ y $\cdot\text{OOCCl}_3$.
Disolvente = pentiletanoato.**

	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCCl}_3$
AH-C2	0.80	0.00
AH-C3	1.48	---
AH-C4	0.33	---
AH-C5	0.29	---
AH-C6	29.29	91.63
AH-C7	0.22	---
AH-C8	67.59	8.36

Tabla 6.14. Porcentajes para las abstracciones de hidrógeno (AH) en el ácido dihidrolipoico con cinco diferentes radicales. Disolvente = pentiletanoato.

	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCl}_3$
AH-C3	0.02	---	---	---	0.00
AH-C3	0.00	---	---	---	---
AH-C4	0.01	---	---	---	---
AH-C5	0.00	---	---	---	---
AH-C6	6.21	---	---	---	6.50
AH-C7	0.01	---	---	---	---
AH-C8	0.07	---	---	---	2.55
AH-S1	89.47	69.71	76.92	92.92	63.82
AH-S2	4.19	30.29	23.08	7.08	27.13

El orden de reactividad para los radicales dentro de las reacciones de abstracción de hidrógeno en agua es: $\cdot\text{OOH} \approx \cdot\text{OCH}_3 > \cdot\text{OOCHCH}_2 > \cdot\text{OOCH}_3$. Mientras que en medio lipídico, el orden es: $\cdot\text{OCH}_3 > \cdot\text{OOCHCH}_2 > \cdot\text{OOCH}_3 > \cdot\text{OOH}$ es decir, el enlace de hidrógeno en el estado de transición entre H-OO y el grupo carboxilato invierte el orden de reactividad, transformando el radical menos reactivo, $\cdot\text{OOH}$ en el más reactivo.

Todos estos resultados revelan que existen grandes diferencias entre la reactividad del ácido lipoico y el ácido dihidrolipoico, tanto en medio acuoso como en medio lipídico. El ácido lipoico, contrario a lo que comúnmente se asume, no puede ser considerado como un antioxidante porque, aunque es capaz de depurar al $\cdot\text{OH}$ y al $\cdot\text{OCH}_3$, reacciona con ellos con constantes de velocidad que son similares a las reacciones entre radicales libres y objetivos biológicos. Por otra parte, el ácido dihidrolipoico es capaz de reaccionar con radicales de baja reactividad como el $\cdot\text{OOH}$ con constantes de velocidad altas. Esta es una conclusión muy importante de este trabajo.

6.1.2 CISTEÍNA

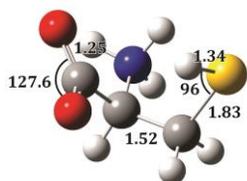
La cisteína presenta tres valores de pK_a :

pK_{a1}	1.71	Desprotonación del grupo α -carboxilo
pK_{a2}	8.33	Desprotonación del grupo tiol
pK_{a3}	10.78	Desprotonación del grupo α -amino

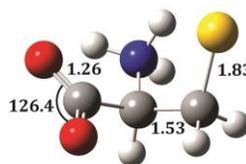
La figura C3, en el apéndice C, deja ver que a $pH = 7.4$ la forma 2, forma zwitteriónica, presenta una abundancia del 89.5% mientras que la forma 3, forma aniónica, el 10.5%. Por tanto, son estas dos especies las que se tienen que considerar para el estudio completo de la capacidad antioxidante de la cisteína.

Geometría.

La estructura más estable obtenida con el método de cálculo M06-2X/6-31++G(d,p)// M06-2X/6-31++G(d,p) para la cisteína zwitteriónica se muestra en la figura 6.22.A. En ésta, el hidrógeno del grupo tiol apunta al grupo carboxilo, que se encuentra desprotonado. Algunos valores en las distancias de enlace y ángulos de enlace se presentan en la misma figura. La estructura de la cisteína aniónica tiene prácticamente la misma geometría que la cisteína zwitteriónica, sin embargo, el azufre se encuentra más alejado del grupo carboxilato debido a que se encuentra desprotonado y por tanto cargado negativamente.



A. Cisteína zwitteriónica

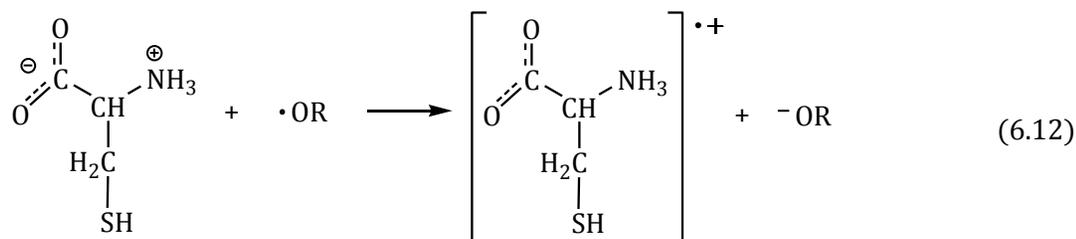


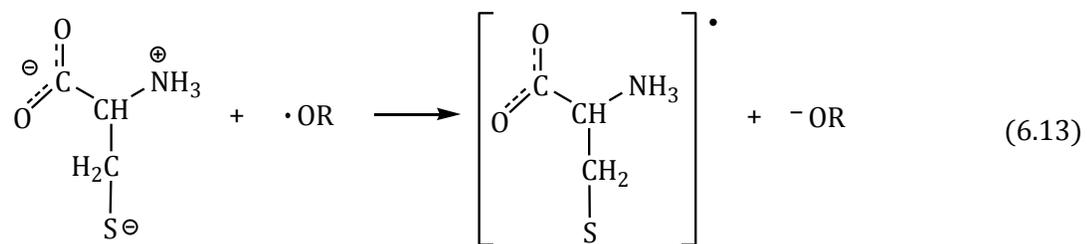
B. Cisteína aniónica

Figura 6.22. Estructuras optimizadas de cisteína zwitteriónica y cisteína aniónica.

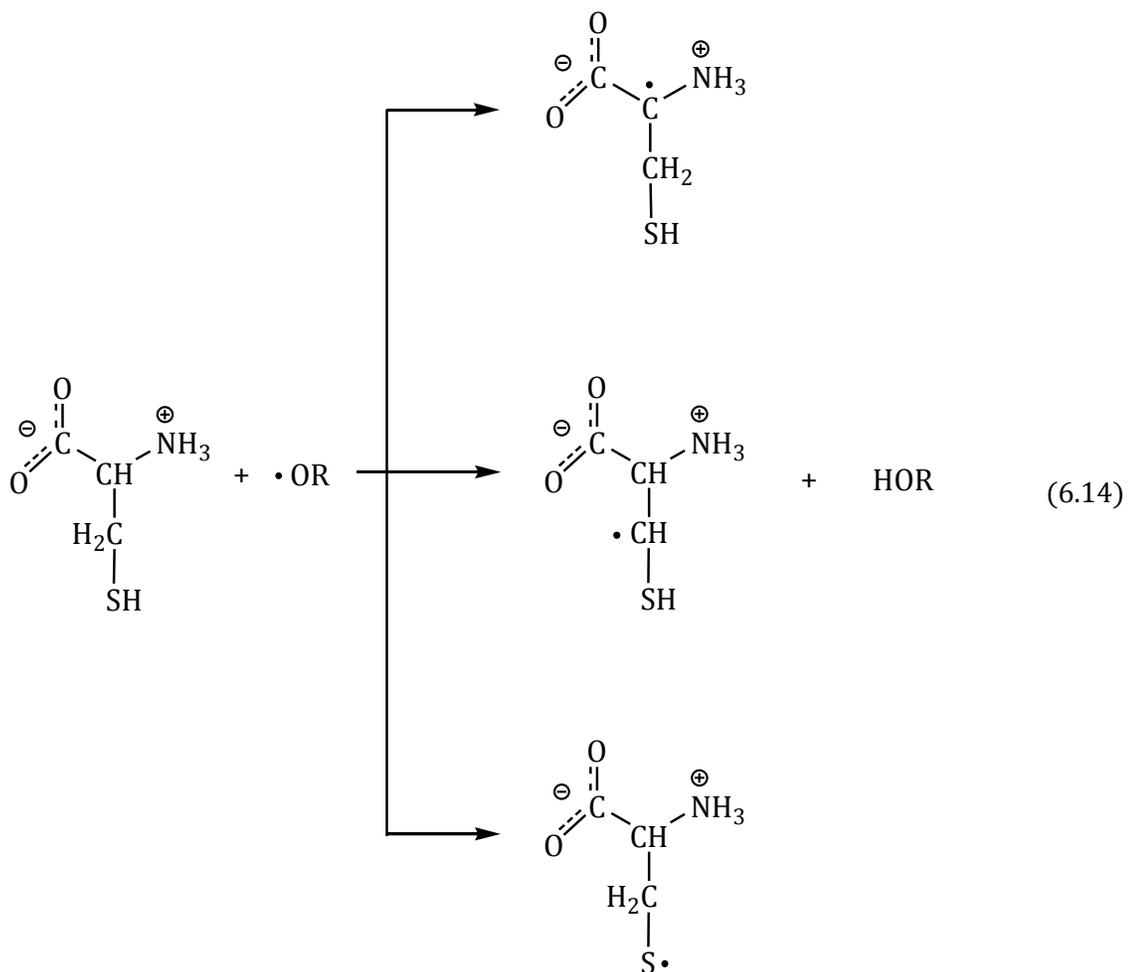
Las reacciones de transferencia electrónica y abstracción de hidrógeno quedan de la siguiente forma:

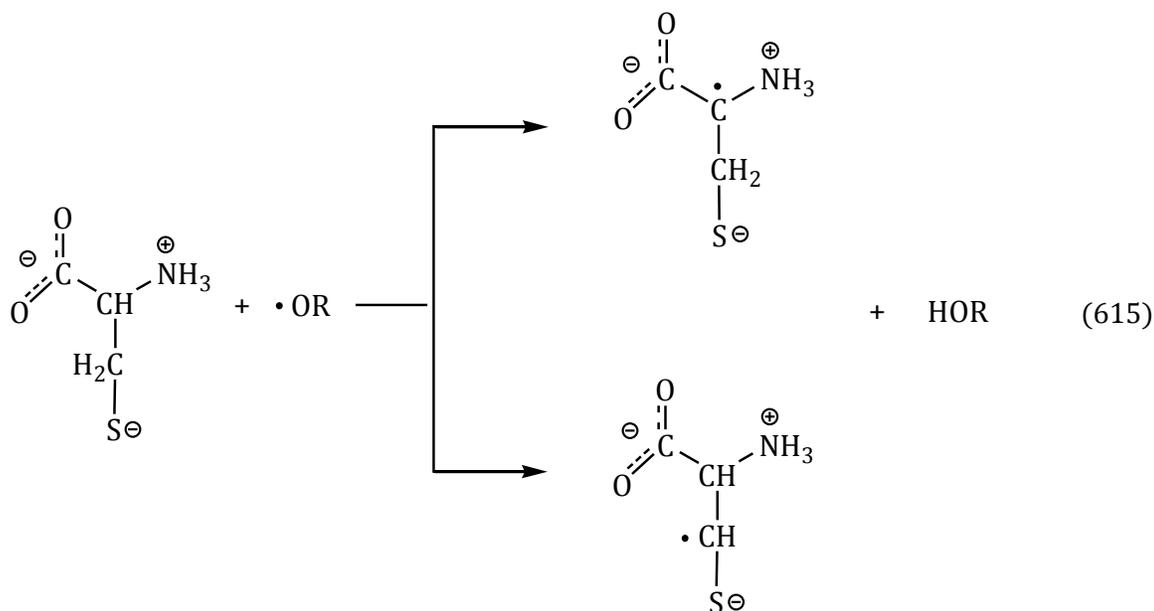
Transferencia electrónica.





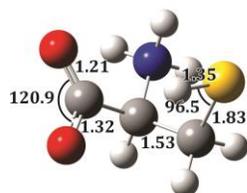
Abstracción de hidrógeno.



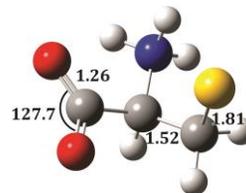


Para determinar la factibilidad de todas estas reacciones es preciso hacer un análisis termodinámico, para esto se necesita tener las estructuras de los productos de cada reacción. La cisteína zwitteriónica, después de la transferencia de un electrón, forma un catión radical, en el cual, presenta significantes diferencias en las distancias C-O del carboxilato así como en el ángulo O-C-O (figura 6.23.A). Estas diferencias en los valores alrededor del grupo carboxilato no son tan grandes cuando las comparamos en la cisteína aniónica y la cisteína radical, que será el producto formado después de la transferencia electrónica. Se observa un ligero cambio en la distancia C-S en esta última (figura 6.23.B).

La reacción 6.14 predice la posible formación de tres radicales al reaccionar la cisteína zwitteriónica (figura 6.24) con alguno de los radicales oxigenados por abstracción de hidrógeno, dos radicales centrados en carbono y uno centrado en azufre. Las estructuras de estos productos radicales se presentan en la figura 6.25. Cada radical centrado en carbono tiene una geometría trigonal plana. Si ocurriera la reacción 6.15 los productos que se formarían sólo serían dos radicales centrados en carbono mostrados en la figura 6.26.

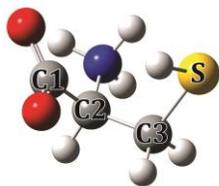


A. Cisteína catión radical

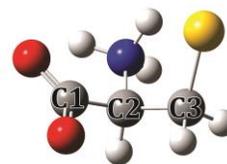


B. Cisteína radical

Figura 6.23. Estructuras optimizadas de los productos de las reacciones de transferencia electrónica de la cisteína zwitteriónica y de la cisteína aniónica.

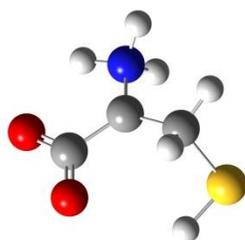


A. Cisteína zwitteriónica

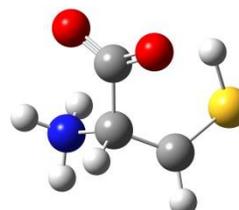


B. Cisteína aniónica

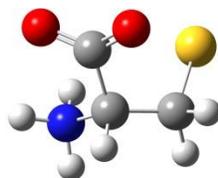
Figura 6.24. Posibles hidrógenos a abstraer en la cisteína A. Zwitteriónica, B. Aniónica.



A. AH-C2

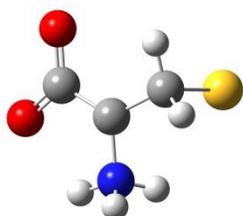


B. AH-C3

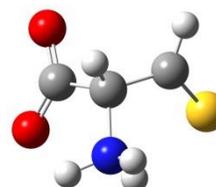


C. AH-S

Figura 6.25. Estructuras optimizadas de los productos de las reacciones de abstracción de hidrógeno de la cisteína zwitteriónica.



AH-C2



AH-C3

Figura 6.26. Estructuras optimizadas de los productos de las reacciones de abstracción de hidrógeno de la cisteína aniónica.

Estudio termodinámico.

En la tabla 6.15 se presentan los valores de ΔG^0 , tanto para la reacción de transferencia electrónica (TE) como para la abstracción de hidrógeno (AH) en todos los sitios posibles de la cisteína zwitteriónica. En esta tabla se muestra que las reacciones de transferencia electrónica de la cisteína zwitteriónica son endergónicas con todos los radicales, por lo tanto no calcularemos las constantes de velocidad. Por otra parte, los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ son capaces de reaccionar con la cisteína por abstracción de hidrógeno y en todos los sitios posibles, dando como resultado reacciones exergónicas. Con el resto de los radicales sólo la reacción de abstracción de hidrógeno del grupo tiol es termodinámicamente favorable. Esto nos indica que la abstracción del hidrógeno del grupo tiol es favorecido termodinámicamente

con radicales de diversa reactividad, por lo que, dentro de la cisteína, el tiol también es un grupo muy reactivo.

Tabla 6.15. ΔG^0 para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en la cisteína zwitteriónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCH}_3$
TE	25.41	50.88	36.63	57.45	51.91	35.03
AH-C2	-23.98	8.16	-8.71	9.87	8.57	0.46
AH-C3	-23.28	8.86	-8.01	10.57	9.27	1.16
AH-S	-34.46	-2.33	-19.19	-0.62	-1.92	-10.03

La cisteína aniónica, de acuerdo con la tabla 6.16, podría reaccionar por transferencia electrónica con todos los radicales utilizados. Además, las abstracciones de hidrógeno en C2 con los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ y las abstracciones en C3 con los seis radicales son termodinámicamente favorables.

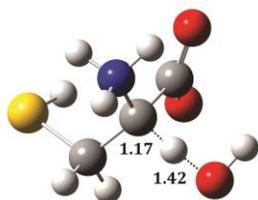
Tabla 6.16. ΔG^0 para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en la cisteína aniónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCH}_3$
TE	-25.07	0.40	-13.85	-2.43	-7.68	-22.64
AH-C2	-25.49	6.65	-10.22	8.36	7.06	-1.05
AH-C3	-34.07	-1.93	-18.80	-0.22	-1.52	-9.64

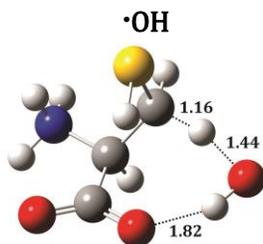
Estudio cinético

Los estados de transición pertenecientes a los canales de abstracción de hidrógeno en la cisteína zwitteriónica se encuentran en la figura 6.27.

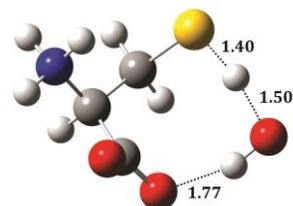
La tabla 6.17 presenta los valores cinéticos para las reacciones de abstracción en la cisteína zwitteriónica con los distintos radicales. En esta tabla los valores de k_{CT} representan las constantes de velocidad (k_{ST} , constante de velocidad sin túnel) considerando el efecto túnel (κ) y los canales de abstracción de hidrógeno degenerados (σ). El radical hidroxilo es el más reactivo, lo que hace que los valores en las constantes de velocidad para las reacciones de abstracción de hidrógeno con la cisteína zwitteriónica sean muy elevados, en el caso de las abstracciones de los hidrógenos en C3 y del hidrógeno del azufre, los valores de las constantes se encuentran limitados por difusión, razón por la cual se calcularon los valores de las constantes de velocidad aparentes (k_{ap}). Otro radical también muy reactivo pero en menor medida que el $\cdot\text{OH}$ es el metoxilo ($\cdot\text{OCH}_3$), de la misma forma, éste es capaz de reaccionar con la cisteína, abstrayendo cualquier tipo de hidrógeno, con velocidades moderadas. Tanto con el hidroxilo como con el metoxilo el valor de la constante de velocidad mayor lo encontramos en la reacción de abstracción del hidrógeno del grupo tiol.



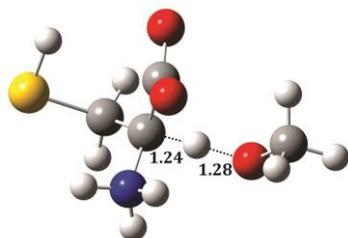
A. AH-C2



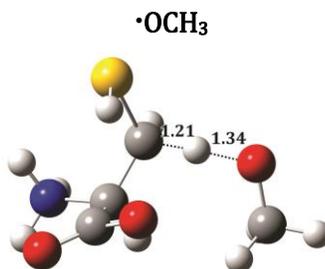
B. AH-C3



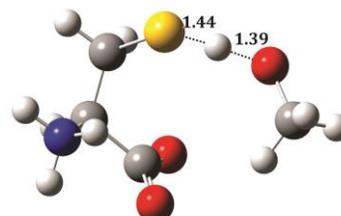
C. AH-S



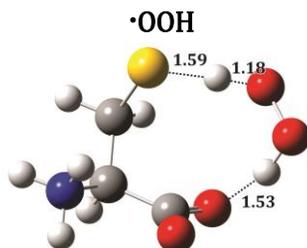
D. AH-C2



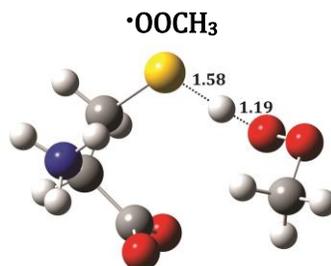
E. AH-C3



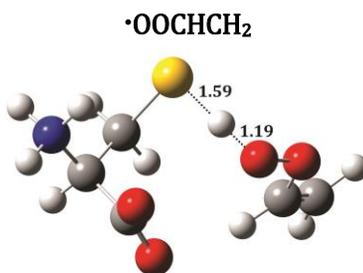
F. AH-S



G. AH-S



H. AH-S



I. AH-S

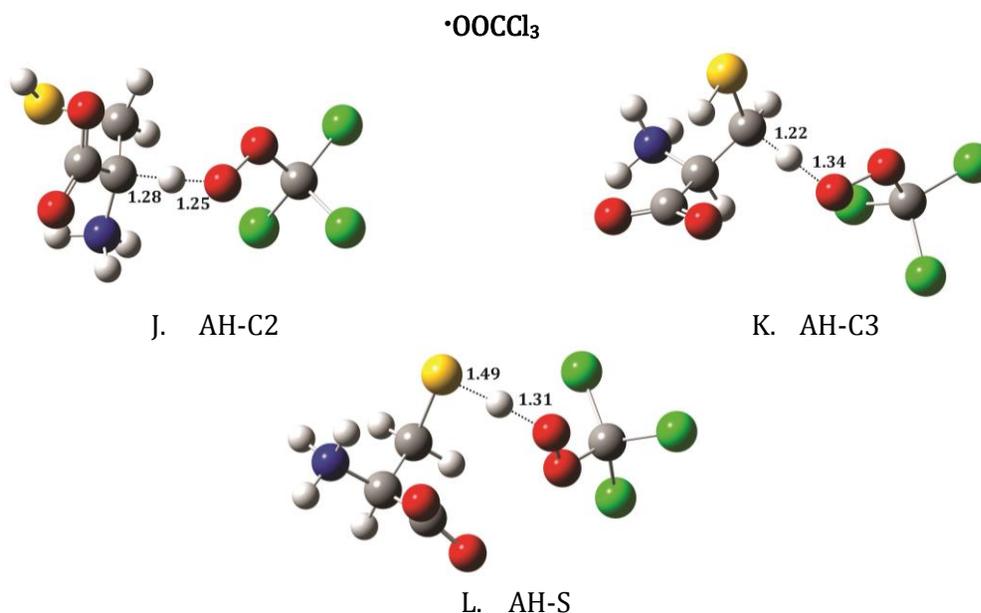


Figura 6.27. Estados de transición para las abstracciones de hidrógeno en la cisteína zwitteriónica.

Tabla 6.17. ΔG^\ddagger (energía libre de activación), k_{ST} (constante de velocidad sin túnel), k_{CT} (constante de velocidad con túnel), σ (caminos de reacción degenerados) y κ (túnel) para la abstracción de hidrógeno (AH) en la cisteína zwitteriónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

Radical	$\cdot\text{OH}$			$\cdot\text{OCH}_3$		
Canal de abstracción	C2	C3	S	C2	C3	S
ΔG^\ddagger	6,36	3,94	1,84	13,75	13,20	7,57
k_{ST}	$1,35 \times 10^8$	$8,05 \times 10^9$	$2,79 \times 10^{11}$	$5,19 \times 10^2$	$1,32 \times 10^3$	$1,76 \times 10^7$
σ	1	2	1	1	2	1
κ	2,16	1,00	1,00	21,03	10,00	2,13
k_{CT}	$2,92 \times 10^8$	$1,61 \times 10^{10}$	$2,79 \times 10^{11}$	$1,09 \times 10^4$	$2,64 \times 10^4$	$3,74 \times 10^7$
k_{ap}	2.67×10^8	2.64×10^9	3.50×10^9			

Radical	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCl}_3$		
Canal de abstracción	S	S	S	C2	C3	S
ΔG^\ddagger	12,11	16,63	15,45	21,08	16,89	14,32
k_{ST}	$8,26 \times 10^3$	4,00	$2,94 \times 10^1$	$2,18 \times 10^{-3}$	$2,60 \times 10^1$	$1,97 \times 10^2$
σ	1	1	1	1	2	1
κ	19,28	58,37	37,52	129,36	10,93	26,11
k_{CT}	$1,59 \times 10^5$	$2,34 \times 10^2$	$1,10 \times 10^3$	$2,83 \times 10^{-1}$	$5,68 \times 10^1$	$5,15 \times 10^3$

Para todos los demás radicales alquilperoxilo el canal de abstracción de hidrógeno favorecido termodinámica y cinéticamente es únicamente el hidrógeno del grupo tiol. De todas estas reacciones, es con el radical hidroperoxilo que se obtiene una constante de velocidad superior que con los demás radicales, este hecho está en contra de lo esperado. El alto valor en la constante de velocidad así como un valor bajo en el ΔG^\ddagger podemos atribuírselo a una interacción, tipo puente de hidrógeno, en el estado de transición entre el hidrógeno del radical hidroperoxilo y uno de los oxígenos del grupo carboxilato de la cisteína (mostrado en la figura 6.27. G), brindándole mayor estabilidad que con los otros radicales donde no se presenta esta interacción.

Los porcentajes atribuidos a cada canal de abstracción de hidrógeno con respecto a los valores de sus constantes de velocidad, calculados mediante la ecuación 6.11, se encuentran en la tabla 6.18. En éstos se observa que la abstracción de hidrógeno ocurre casi exclusivamente en el grupo tiol, por tanto, la constante de velocidad global para el mecanismo de abstracción de hidrógeno se debe, principalmente, a esta reacción.

Tabla 6.18. Porcentajes para las abstracciones de hidrógeno (AH) en la cisteína zwitteriónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCL}_3$
AH-C2	0,1	---	0,0	---	---	0,0
AH-C3	5,5	---	0,1	---	---	1,1
AH-S	94,4	100,00	99,9	100,0	100,0	98,9

Todas las reacciones de transferencia electrónica con la forma aniónica de la cisteína, excepto con el $\cdot\text{OOH}$, son controladas por difusión. Las constantes de velocidad calculadas por medio de la Teoría de Marcus y la Teoría Convencional del Estado de Transición, así como, las constantes de velocidad aparentes se encuentran en la tabla 6.19. Debido a que una reacción por transferencia electrónica puede ocurrir a una distancia mayor que una reacción por abstracción de hidrógeno y, además, las reacciones por transferencia electrónica en la cisteína aniónica están controladas por difusión, no se calcularon las reacciones por abstracción de hidrógeno en esta forma de la cisteína a pesar de ser exergónicas.

Tabla 6.19. Valores para λ , ΔG^\ddagger , y constantes de velocidad en el mecanismo de transferencia electrónica entre la cisteína aniónica y diferentes radicales. Disolvente = agua.

Radical	λ (kcal/mol)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{ap} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
$\cdot\text{OH}$	19.18	0.45	2.90×10^{12}	8.03×10^9
$\cdot\text{OOH}$	29.42	7.55	1.80×10^7	1.80×10^7
$\cdot\text{OCH}_3$	14.29	0.0034	6.18×10^{12}	7.77×10^9
$\cdot\text{OOCH}_3$	22.50	4.47	3.27×10^9	2.28×10^9
$\cdot\text{OOCHCH}_2$	22.10	2.35	1.17×10^{11}	7.04×10^9
$\cdot\text{OOCCL}_3$	23.48	0.01	6.13×10^{12}	7.43×10^9

El único canal de abstracción de hidrógeno para la cisteína aniónica que podemos considerar es con el radical $\cdot\text{OOH}$ en el grupo CH_2 . La estructura de transición correspondiente se

muestra en la figura 6.28. Los valores de ΔG^\ddagger y las constantes de velocidad para esta reacción de abstracción de hidrógeno se muestran en la tabla 6.20.

Tabla 6.20. ΔG^\ddagger (energía libre de activación), k_{ST} (constante de velocidad sin túnel), k_{CT} (constante de velocidad con túnel), σ (caminos de reacción degenerados) y κ (túnel) para la abstracción de hidrógeno (AH) en la cisteína aniónica con el radical hidroperoxilo. Disolvente = agua.

Radical	$\cdot\text{OOH}$
Canal de abstracción	C3
ΔG^\ddagger	7.80
k_{ST}	1.19×10^7
σ	2
κ	3.83
k_{CT}	9.14×10^7

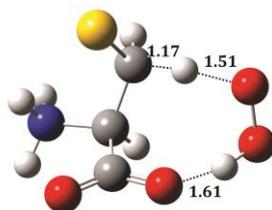


Figura 6.28. Abstracción de hidrógeno del grupo CH_2 en la cisteína aniónica por el radical $\cdot\text{OOH}$.

Ahora que tenemos las constantes de velocidad para las reacciones de abstracción de hidrógeno, en los diferentes canales termodinámicamente favorecidos, y transferencia electrónica podemos determinar las constantes totales de la cisteína zwitteriónica y de la cisteína aniónica mediante la fórmula:

$$k_{total} = x(\sum k_i^{AH} + k^{TE}) \quad (6.16)$$

Donde x es la fracción molar, en este caso, $x_{(zwitteriónica)} = 0.895$ y $x_{(aniónica)} = 0.105$ son las fracciones molares en la que la cisteína zwitteriónica y de la cisteína aniónica se encuentran presentes a pH 7.4, el primer término dentro del paréntesis corresponde a la suma de las constantes de velocidad de todas las abstracciones de hidrógeno y el segundo término es la constante de velocidad de la reacción de transferencia electrónica. Además, calculamos las constantes globales en la cisteína con cada uno de los radicales utilizados, de acuerdo con la fórmula:

$$k_{global}^{cisteína} = k_{total}^{zwitteriónica} + k_{total}^{aniónica} \quad (6.17)$$

Los resultados de las constantes totales y globales se presentan en la tabla 4.21.

Tabla 6.21. Constantes totales y globales ($M^{-1} s^{-1}$) para la cisteína zwitteriónica y cisteína aniónica.

Radical	$k_{total}^{zwitteri3nica}$	$k_{total}^{ani3nica}$	$k_{global}^{ciste3na}$
$\bullet OH$	5.73×10^9	8.43×10^8	6.58×10^9
$\bullet OOH$	1.42×10^5	1.15×10^7	1.16×10^7
$\bullet OCH_3$	3.35×10^7	8.16×10^8	8.49×10^8
$\bullet OOCH_3$	2.09×10^2	2.40×10^8	2.40×10^8
$\bullet OOCHCH_2$	9.87×10^2	7.81×10^8	7.39×10^8
$\bullet OOCCL_3$	4.66×10^3	9.48×10^8	7.81×10^8

En resumen, la cisteína zwitteriónica reacciona exclusivamente por abstracción de hidrógeno y sólo con los radicales de mayor reactividad, $\bullet OH$ y $\bullet OCH_3$, se tienen las constantes de velocidad más altas. Mientras que la cisteína aniónica reacciona por transferencia electrónica con constantes de velocidad controladas por difusión con todos los radicales.

6.1.3 TIOPRONINA.

De la misma forma que se realizó el análisis sobre el mecanismo atrapador de radicales libres con los ácidos lipoico y dihidrolipoico y con la cisteína se hizo para la tiopronina.

La tiopronina tiene dos constantes de acidez importantes para nosotros, una perteneciente a la desprotonación del grupo carboxilo y otra por la desprotonación del grupo tiol. A $pH=7.4$ se van a encontrar tanto la especie aniónica como la especie dianiónica de la tiopronina, y son ambas especies con las que vamos a trabajar. De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, a este valor de pH , la especie aniónica se encontrará en una proporción del 95.62% con respecto a la especie dianiónica que estará presente solo en un 4.38%.

Geometría.

Las estructuras más estables encontradas para las dos formas más abundantes de la tiopronina a $pH=7.4$ son las presentadas en la figura 6.29. En ésta, también se encuentran algunos valores en las distancias de enlace y ángulos de enlace.

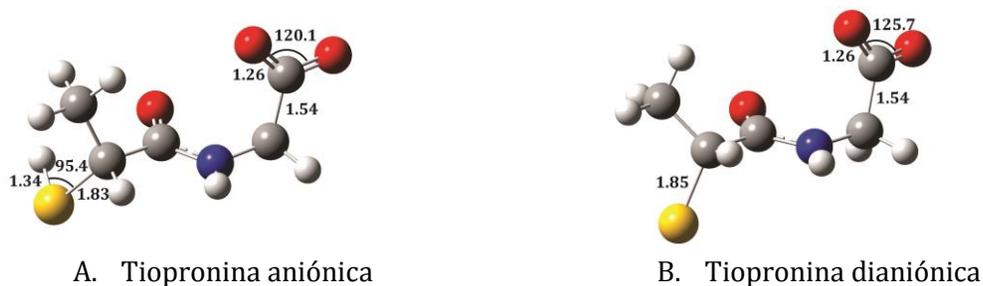
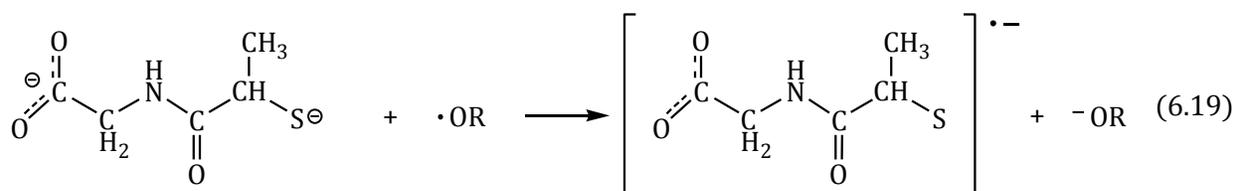
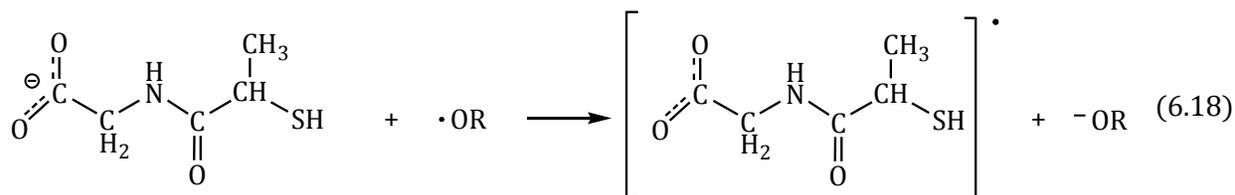


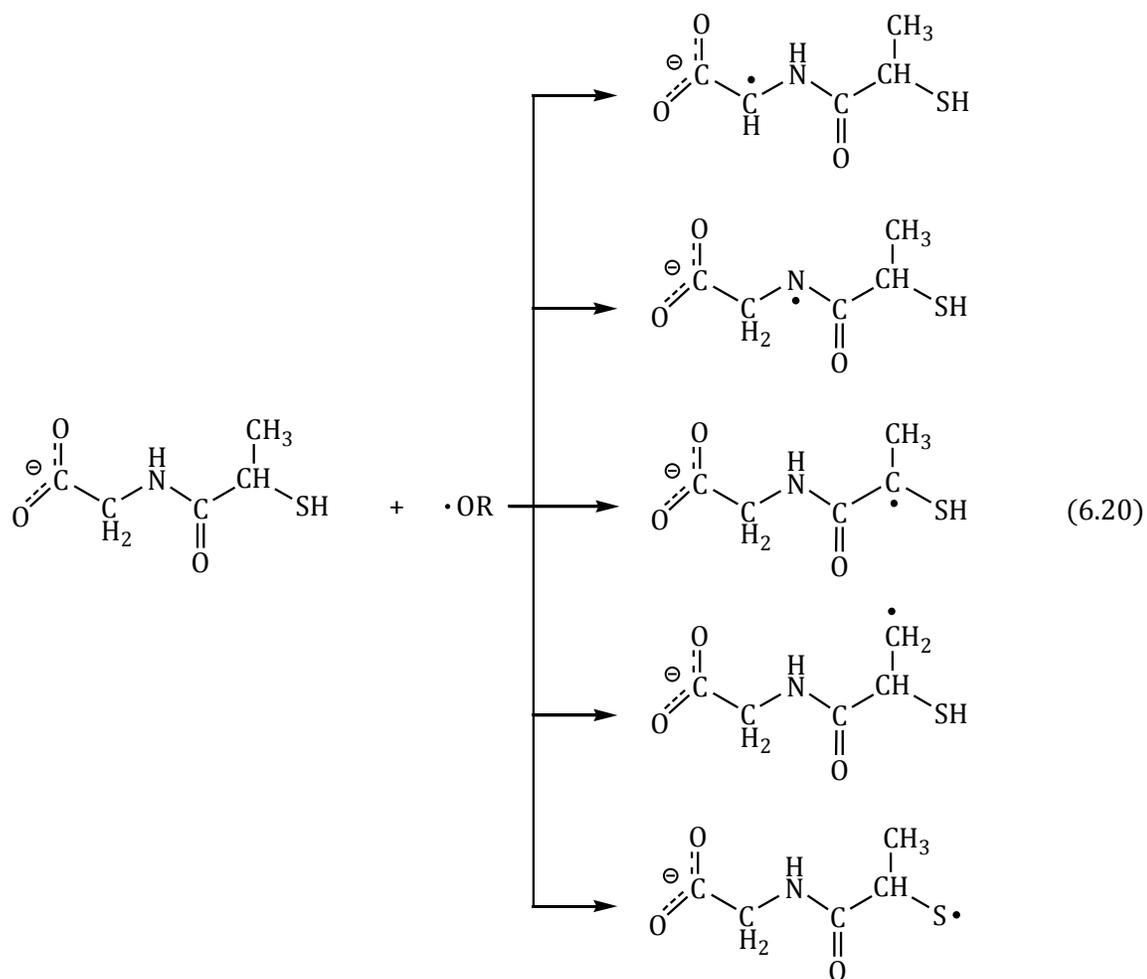
Figura 6.29. Estructuras optimizadas de tiopronina aniónica y tiopronina dianiónica.

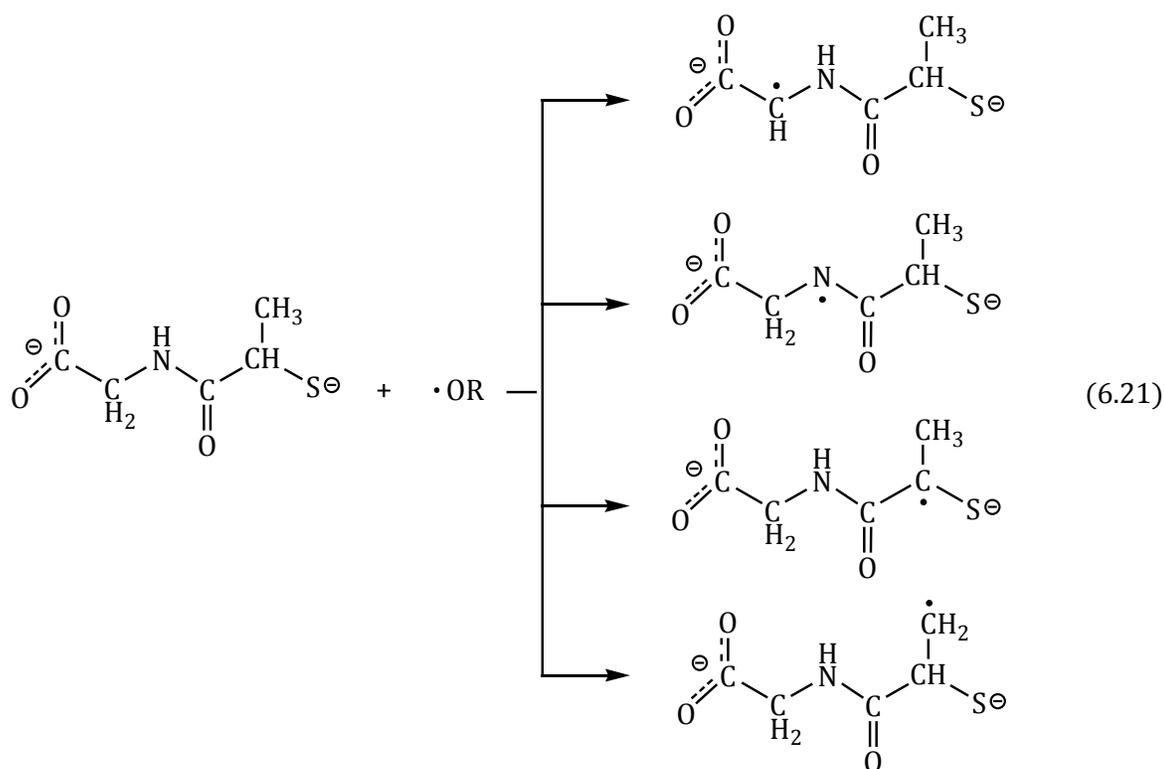
Las reacciones de transferencia electrónica y abstracción de hidrógeno en la tiopronina aniónica y tiopronina dianiónica son las siguientes:

Transferencia electrónica.

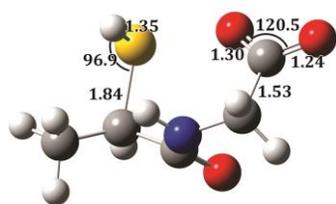


Abstracción de hidrógeno.

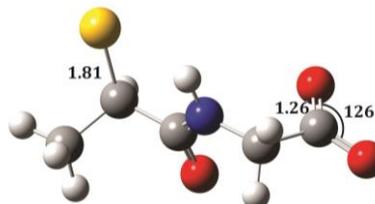




Después de la transferencia electrónica, la tiopronina aniónica formará un radical como lo describe la reacción 6.18. Este radical, además de cambios en su geometría, presenta pequeñas diferencias en las distancias C-O del carboxilato (figura 6.30.A), esto nos podría indicar que fue de este sitio donde se transfirió el electrón. La forma de la tiopronina con el tiol desprotonado dará, como resultado de la transferencia de un electrón, un anión radical, el cual tiene un ligero cambio en la distancia C-S (figura 6.30.B).



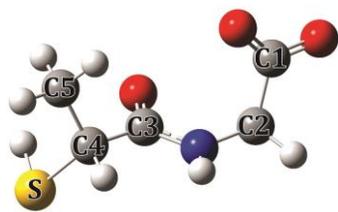
A. Tiopronina radical



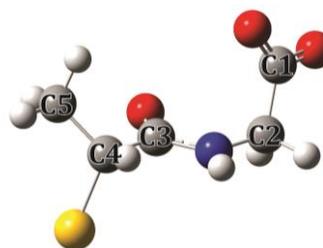
B. Tiopronina anión radical

Figura 6.30. Estructuras optimizadas de los productos de las reacciones de transferencia electrónica de la tiopronina radical y de la tiopronina anión radical.

Las etiquetas utilizadas en cada una de las distintas abstracciones de hidrógeno, tanto para la tiopronina aniónica como para la tiopronina dianiónica, están presentes en la figura 6.31.



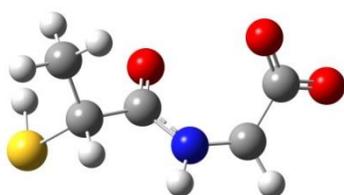
A. Tiopronina aniónica



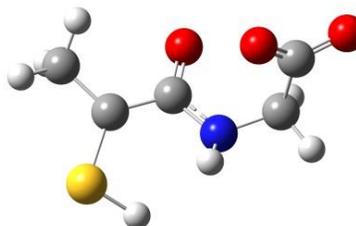
B. Tiopronina dianiónica

Figura 6.31. Posibles hidrógenos a abstraer en la tiopronina A. Aniónica, B. Dianiónica.

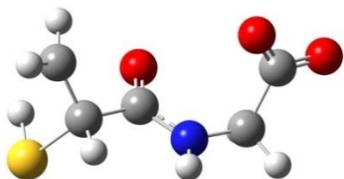
Los posibles productos de la reacción de abstracción de hidrógeno en la tiopronina aniónica son: tres radicales centrados en carbono, uno centrado en azufre y uno centrado en nitrógeno (Figura 6.32). Los radicales centrados en carbono presentan geometría trigonal plana mientras que el radical centrado en nitrógeno tiene geometría angular. Por otro lado, tres radicales centrados en carbono y un radical centrado en nitrógeno serían los productos de la reacción de abstracción de hidrógeno en la tiopronina dianiónica, como se presentan en la Figura 6.33.



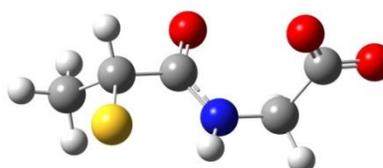
A. AH-C2



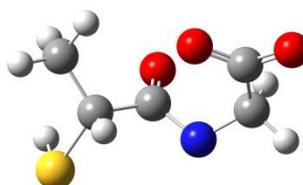
B. AH-C4



C. AH-C5



D. AH-S



E. AH-N

Figura 6.32. Estructuras optimizadas de los productos de las reacciones de abstracción de hidrógeno de la tiopronina aniónica.

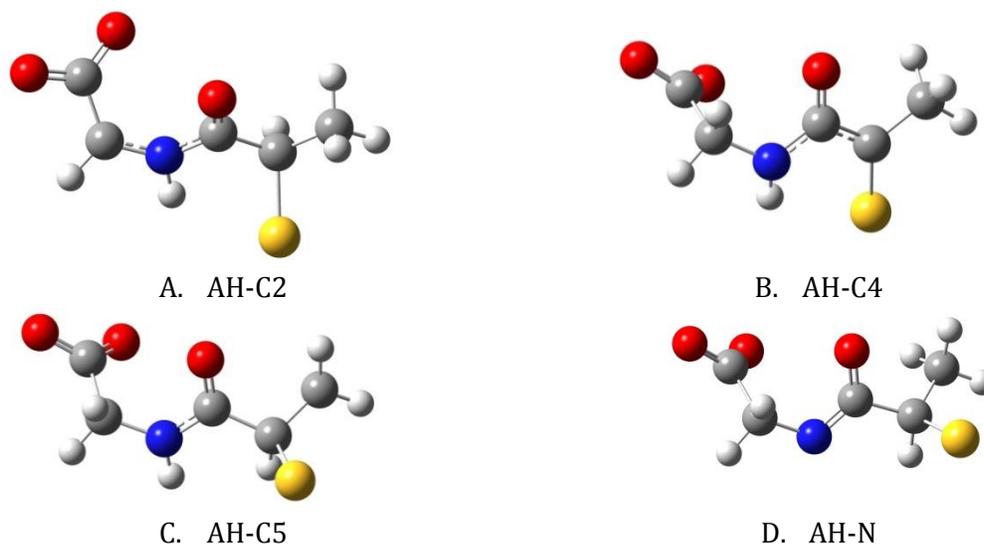


Figura 6.33. Estructuras optimizadas de los productos de las reacciones de abstracción de hidrógeno de la tiopronina dianiónica.

Estudio termodinámico.

Los resultados del estudio termodinámico, es decir, los valores de ΔG^0 tanto para las reacciones de abstracción de los diferentes hidrógenos que tiene la tiopronina como para la reacción de transferencia electrónica con los diversos radicales utilizados se muestran en la tabla 6.22. Estos valores indican que ninguna de las reacciones por transferencia electrónica de la tiopronina aniónica con estos radicales es termodinámica favorable, todas son endergónicas. Sin embargo, algunas de las reacciones de abstracción de hidrógeno en la tiopronina aniónica se ven favorecidas termodinámica. Con los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ se favorecen las reacciones de abstracción en todos los sitios posibles, de la misma forma que ocurrió con el lipoato, el dihidrolipoato y la cisteína zwitteriónica. Con todos los radicales, excepto el $\cdot\text{OOCH}_3$, la reacción de abstracción de hidrógeno del grupo tiol es termodinámica favorable. Esto nos indica que la tiopronina aniónica podría reaccionar con radicales de diversa reactividad por la abstracción del hidrógeno del grupo tiol.

Tabla 6.22. ΔG de reacción para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en la tiopronina aniónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCH}_3$
TE	18.53	44.00	29.75	41.17	35.92	20.97
AH-C2	-26.05	6.09	-10.78	7.80	6.50	-1.62
AH-C4	-31.24	0.90	-15.97	2.61	1.31	-6.81
AH-C5	-20.49	11.65	-5.21	13.36	12.06	3.95
AH-N	-12.79	19.35	2.48	21.06	19.76	11.64
AH-S	-33.69	-1.55	-18.42	0.16	-1.14	-9.26

En la tiopronina dianiónica, como puede verse en la tabla 6.23, la reacción de transferencia electrónica es favorecida termodinámicamente a diferencia que en la tiopronina aniónica. De la misma forma, son favorecidas las reacciones por abstracción de hidrógeno con el radical $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OCH}_3$ por todos los canales posibles, mientras que con los radicales alquil peroxilo solo se favorecen las reacciones de abstracción del hidrógeno en C4.

Tabla 6.23. ΔG de reacción para la transferencia electrónica (TE) y abstracción de hidrógeno (AH) en la tiopronina dianiónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OOCCH}_3$
TE	-27.09	-1.62	-15.87	-4.45	-9.70	-24.66
AH-C2	-27.00	5.13	-11.73	6.84	5.54	-2.57
AH-C4	-47.79	-15.65	-32.52	-13.94	-15.24	-23.35
AH-C5	-21.59	10.55	-6.32	12.26	10.96	2.84
AH-N	-24.96	7.18	-9.69	8.89	7.59	-0.53

Estudio cinético

La tiopronina aniónica presenta cuatro diferentes grupos funcionales con hidrógenos, los cuales tienen la posibilidad de ser abstraídos. Estos canales de abstracción de hidrógeno en este compuesto (C2, C4, C5 y S) se encuentran en la figura 6.31.

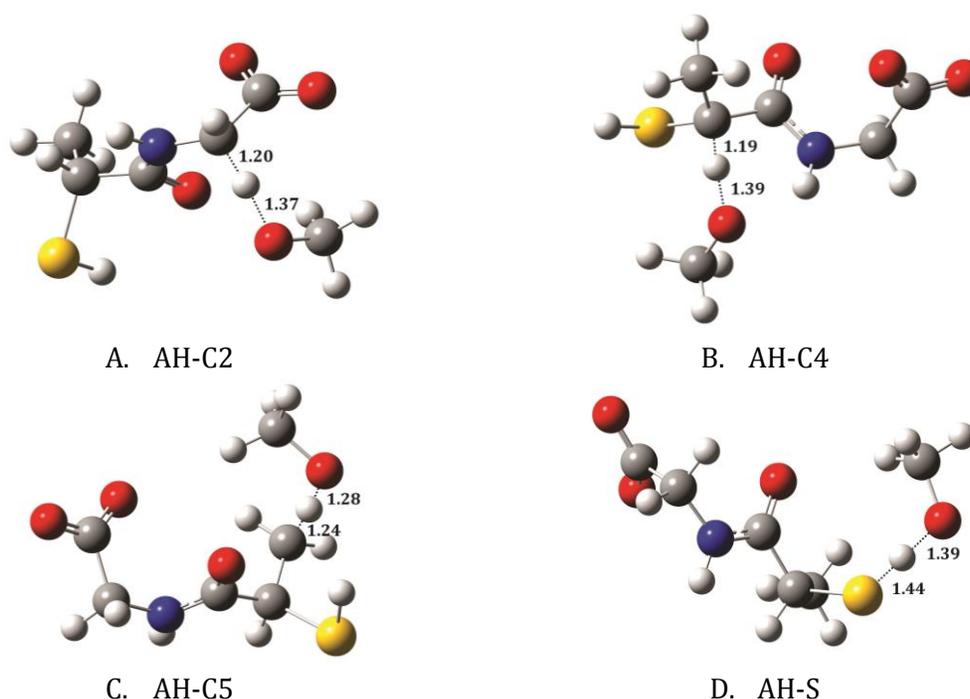


Figura 6.34. Estados de transición para los canales de abstracción de hidrógeno para la tiopronina aniónica con el radical $\cdot\text{OCH}_3$.

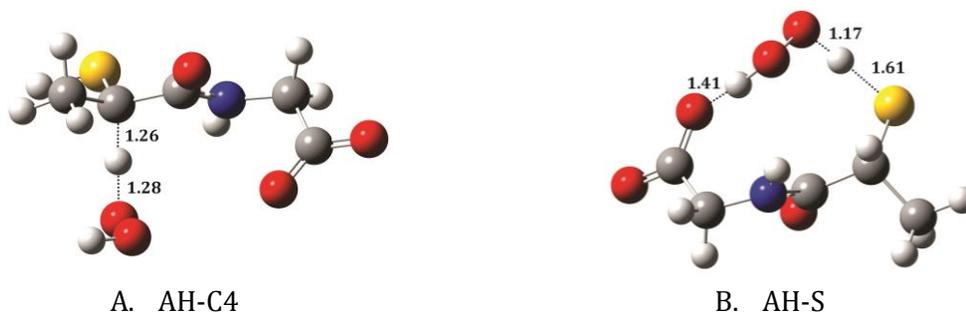


Figura 6.35. Estados de transición para los canales de abstracción de hidrógeno para la tiopronina aniónica con el radical $\cdot\text{OOH}$.

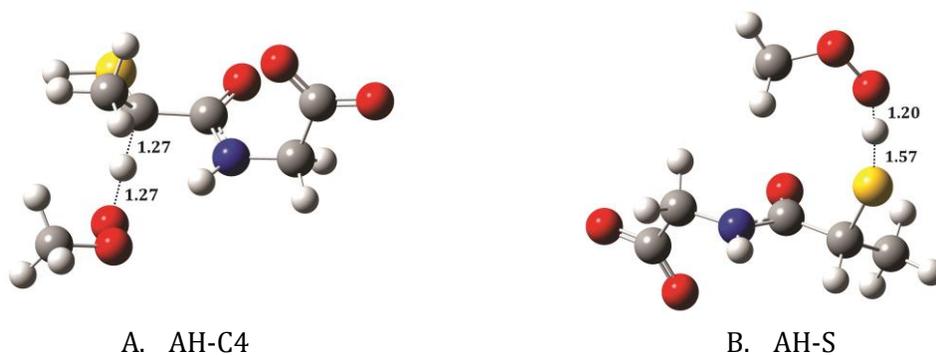


Figura 6.36. Estados de transición para los canales de abstracción de hidrógeno para la tiopronina aniónica con el radical $\cdot\text{OOCH}_3$.

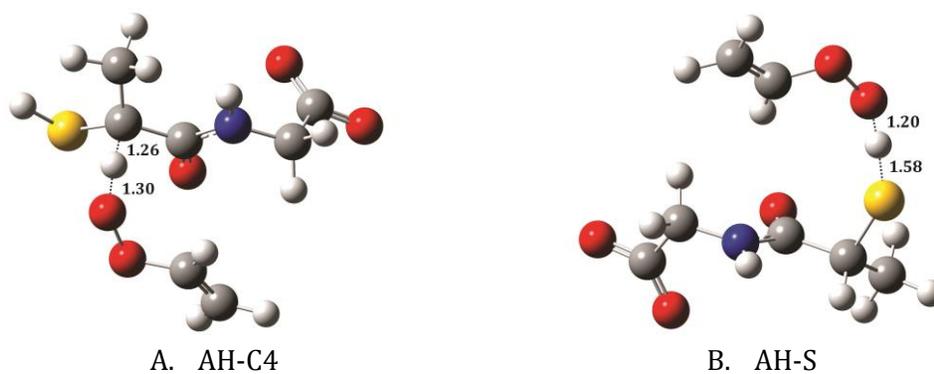


Figura 6.37. Estados de transición para los canales de abstracción de hidrógeno para la tiopronina aniónica con el radical $\cdot\text{OCH}_2\text{CO}$.

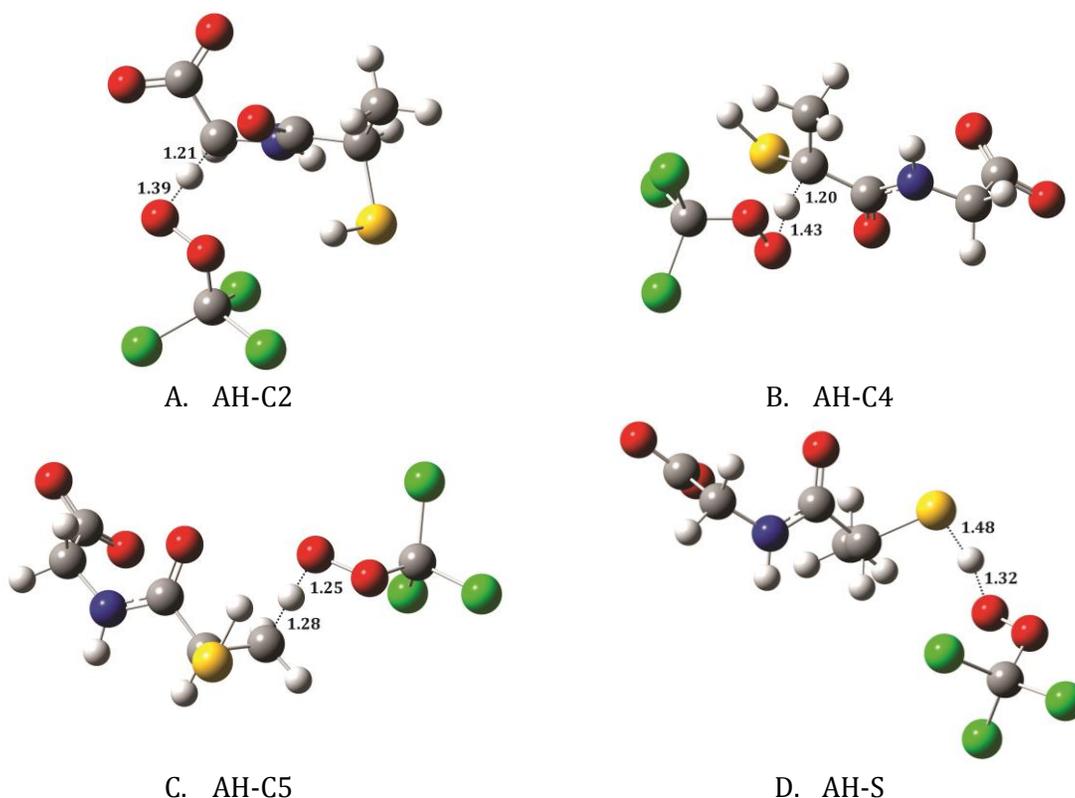


Figura 6.38. Estados de transición para los canales de abstracción de hidrógeno para la tiopronina aniónica con el radical $\cdot\text{OOCCH}_3$.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 6.22, calculamos la energía de los estados de transición para todas las reacciones exergónicas y para algunas endergónicas que tienen un valor pequeño en su ΔG^0 , por ejemplo la abstracción del hidrógeno del grupo SH con el radical $\cdot\text{OOCCH}_3$. Con estos valores de energía pudimos calcular el ΔG^\ddagger para cada reacción así como su constante de velocidad (k_{ST} , constante de velocidad sin túnel). La constante de velocidad considerando el efecto túnel (k_{CT}) la calculamos como el producto de k_{ST} , σ (camino de reacción degenerados) y κ (túnel).

Los valores de ΔG^\ddagger , k_{ST} , σ , κ y k_{CT} calculadas para cada reacción de abstracción de hidrógeno en la tiopronina aniónica con cada uno de los radicales se presentan en la tabla 6.24.

Tabla 6.24. ΔG^\ddagger (energía libre de activación), k_{ST} (constante de velocidad sin túnel), k_{CT} (constante de velocidad con túnel), σ (caminos de reacción degenerados) y κ (túnel) para la abstracción de hidrógeno (AH) en la tiopronina aniónica con cinco diferentes radicales. Disolvente = agua.

	•OOH			•OCH₃		
	C4	S	C2	C4	C5	S
ΔG^\ddagger (kcal/mol)	20.32	7.76	10.93	10.86	14.30	8.42
$k_{ST}(M^{-1}s^{-1})$	7.94×10^{-3}	1.26×10^7	6.03×10^4	6.74×10^4	2.03×10^2	4.16×10^6
σ	1.00	1	2	1	3	1
κ	157.61	1.00	5.33	2.62	13.48	2.31
$k_{CT}(M^{-1}s^{-1})$	1.25	1.26×10^7	6.43×10^5	1.77×10^5	8.23×10^3	9.60×10^6
•OOCH₃						
	C4	S	C2	C4	C5	S
ΔG^\ddagger (kcal/mol)	21.37	15.34	12.91	14.15	16.87	15.75
$k_{ST}(M^{-1}s^{-1})$	1.34×10^{-3}	3.54×10^1	2.12×10^3	2.64×10^2	2.65	1.77×10^1
σ	1	1	2	1	3	1
κ	180.10	46.71	3.62	4.93	16.76	1136.76
$k_{CT}(M^{-1}s^{-1})$	2.42×10^{-1}	1.65×10^3	1.54×10^4	1.30×10^3	1.33×10^2	2.01×10^4
•OOCHCH₂						
	C4	S				
ΔG^\ddagger (kcal/mol)	18.87	15.56				
$k_{ST}(M^{-1}s^{-1})$	9.15×10^{-2}	2.43×10^1				
σ	1	1				
κ	67.09	30.20				
$k_{CT}(M^{-1}s^{-1})$	6.14	7.33×10^2				

Otro radical también muy reactivo, pero en menor medida que el $\cdot\text{OH}$, lo es el radical $\cdot\text{OCH}_3$. Este radical también es capaz de reaccionar con la tiopronina aniónica abstrayendo cualquier tipo de hidrógeno con velocidades moderadas. Para este radical, la reacción de abstracción del hidrógeno unido a azufre es más rápida que las abstracciones de cualquiera de los hidrógenos unidos a carbono.

Algo importante de mencionar es que para el radical $\cdot\text{OOH}$ encontramos que la reacción de abstracción del hidrógeno del grupo tiol tiene una constante de velocidad relativamente alta, $k = 1.26 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, considerando que este radical es de menor reactividad que el $\cdot\text{OCH}_3$, el cual tiene una constante de velocidad para la abstracción de este mismo hidrógeno de $9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este hecho podemos atribuírselo, también en este caso, a que el hidrogeno del radical $\cdot\text{OOH}$ forma un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo de la tiopronina en el estado de transición (figura 6.35.B), lo cual, hace que el ΔG^\ddagger sea menor y por tanto, la constante de velocidad mayor que aquel donde no se hubiera considerado el puente de hidrógeno. Éste es el mismo fenómeno observado en el dihidrolipoato y en la cisteína zwitteriónica.

Para el resto de los radicales se obtiene la misma relación entre las constantes de velocidad que para los radicales antes mencionados, es decir, el valor más alto se tiene para la abstracción del hidrógeno unido a azufre, encontrando como menos reactivo de todos al radical $\cdot\text{OOCHCH}_2$.

Los porcentajes atribuidos a cada canal de abstracción de hidrógeno con respecto a los valores en sus constantes de velocidad se encuentran en la tabla 6.25. Se observa que la abstracción de hidrógeno ocurre casi exclusivamente en el grupo tiol, por tanto, la constante de velocidad global para el mecanismo de abstracción se debe, principalmente a esta reacción.

Tabla 6.25. Porcentajes para las abstracciones de hidrógeno (AH) en la tiopronina aniónica con seis diferentes radicales. Disolvente = agua.

	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	$\cdot\text{OCH}_3$	$\cdot\text{OOCH}_3$	$\cdot\text{OOCHCH}_2$	$\cdot\text{OCCl}_3$
C2	31.2	---	6.2	---	---	41.6
C4	8.7	0.0	1.7	0.0	0.8	3.5
C5	21.5	---	0.1	---	---	0.4
S	38.7	100.0	92.0	100.0	99.2	54.5

La tiopronina dianiónica reacciona por transferencia electrónica a velocidades controladas por difusión, por lo que calculamos las constantes de velocidad sólo para este tipo de reacción. Todas estas reacciones son exergónicas. Utilizando la teoría de Marcus calculamos la ΔG^\ddagger que correspondiente a la reacción entre la tiopronina dianiónica y cada radical, por transferencia electrónica. Con este valor, determinamos la constante de velocidad asociada a estas reacciones, las cuales se presentan en la tabla 6.26.

Tabla 6.26. Valores para ΔG^\ddagger , y constantes de velocidad en el mecanismo de transferencia electrónica entre la tiopronina dianiónica y diferentes radicales. Disolvente= agua.

Radical	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{ap} (M ⁻¹ s ⁻¹)
•OH	2.02	2.05 x 10 ¹¹	7.97 x 10 ⁹
•OOH	5.72	3.98 x 10 ⁸	3.79 x 10 ⁸
•OCH ₃	0.57	2.39 x 10 ¹²	7.93 x 10 ⁹
•OOCH ₃	2.81	5.41 x 10 ¹⁰	6.74 x 10 ⁹
•OOCHCH ₂	1.08	9.96 x 10 ¹¹	7.52 x 10 ⁹
•OCCl ₃	0.26	4.01 x 10 ¹²	7.49 x 10 ⁹

Finalmente, calculamos las constantes de velocidad totales y las constantes de velocidad globales, aplicando las fórmulas 6.16 y 6.22, para la tiopronina aniónica y para la tiopronina dianiónica. Los valores de estas constantes se encuentran en la tabla 6.27.

$$k_{global}^{tiopronina} = k_{total}^{aniónica} + k_{total}^{dianiónica} \quad (6.22)$$

Tabla 6.27. Constantes totales y globales para la tiopronina aniónica y dianiónica con los diferentes radicales. Disolvente= agua.

Radical	k _{total} ^{aniónica}	k _{total} ^{dianiónica}	k _{global} ^{tiopronina}
•OOH	1.21 x 10 ⁷	1.66 x 10 ⁷	2.87 x 10 ⁷
•OCH ₃	9.98 x 10 ⁶	3.47 x 10 ⁸	3.57 x 10 ⁸
•OOCH ₃	1.58 x 10 ³	2.95 x 10 ⁸	2.95 x 10 ⁸
•OOCHCH ₂	7.07 x 10 ²	3.29 x 10 ⁸	3.29 x 10 ⁸
•OCCl ₃	3.53 x 10 ⁴	3.28 x 10 ⁸	3.28 x 10 ⁸

El principal mecanismo por el que la tiopronina aniónica reacciona es por abstracción del hidrógeno del grupo tiol. Aunque el radical •OOH es de baja reactividad, éste reacciona con una constante de velocidad incluso mayor que la constante de velocidad del radical •OCH₃, esto ocurre por la fuerte interacción tipo puente de hidrógeno del radical •OOH con el grupo carboxilato de la tiopronina.

La tiopronina dianiónica, reacciona con los cinco radicales utilizados por medio de transferencia electrónica con constantes de velocidad controladas por difusión.

6.1.4 Comparaciones.

El dihidrolipoato, la cisteína zwitteriónica y la tiopronina aniónica tienen en común su grupo carboxilo desprotonado, esto hace que al reaccionar con el radical •OOH por abstracción de hidrógeno se forme un puente de hidrógeno en el estado de transición correspondiente, como se mencionó anteriormente. Si comparamos las estructuras de los tres estados de transición (figura 6.39) además de sus valores de ΔG^\ddagger y constantes de velocidad notamos que la mejor

interacción entre el hidrógeno del radical $\cdot\text{OOH}$ y el grupo carboxilato del antioxidante se da en el dihidrolipoato y, en consecuencia, la reacción tiene una constante de velocidad mayor que los otros dos antioxidantes. La distancia óptima entre el tiol y el carboxilato en el dihidrolipoico para que ocurra éste fenómeno lo hace un excelente antioxidante.

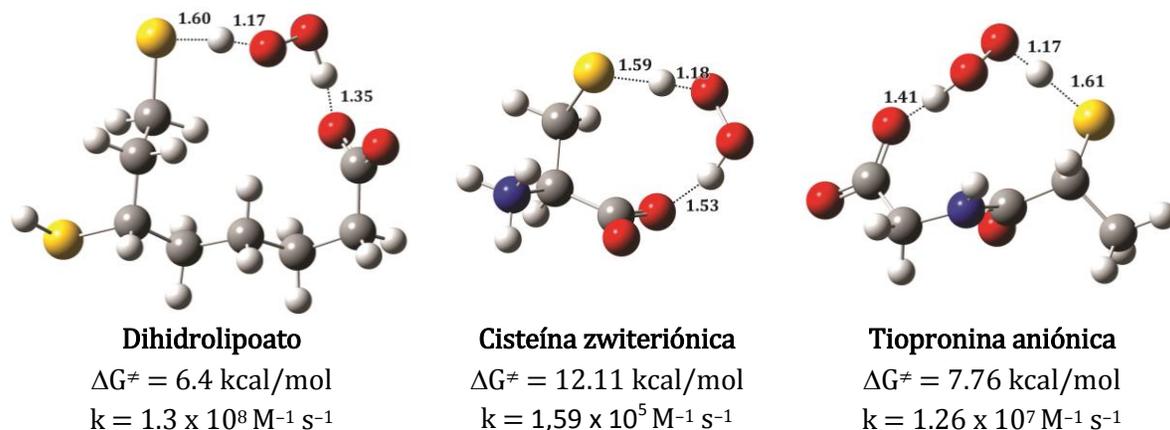


Figura 6.39. Puente de hidrógeno en los estados de transición de las reacciones de abstracción de hidrógeno en el dihidrolipoato, la cisteína zwiteriónica y la tiopronina aniónica con el radical $\cdot\text{OOH}$

Al analizar orbitales frontera de los productos de las diferentes especies que reaccionan por transferencia electrónica, notamos que en las tres especies, el orbital HOMO (en la Figura 6.40) se sitúa preferentemente en los átomos de azufre. Esto nos lleva a establecer que el electrón se transfiere desde los grupos tiol y disulfuro.

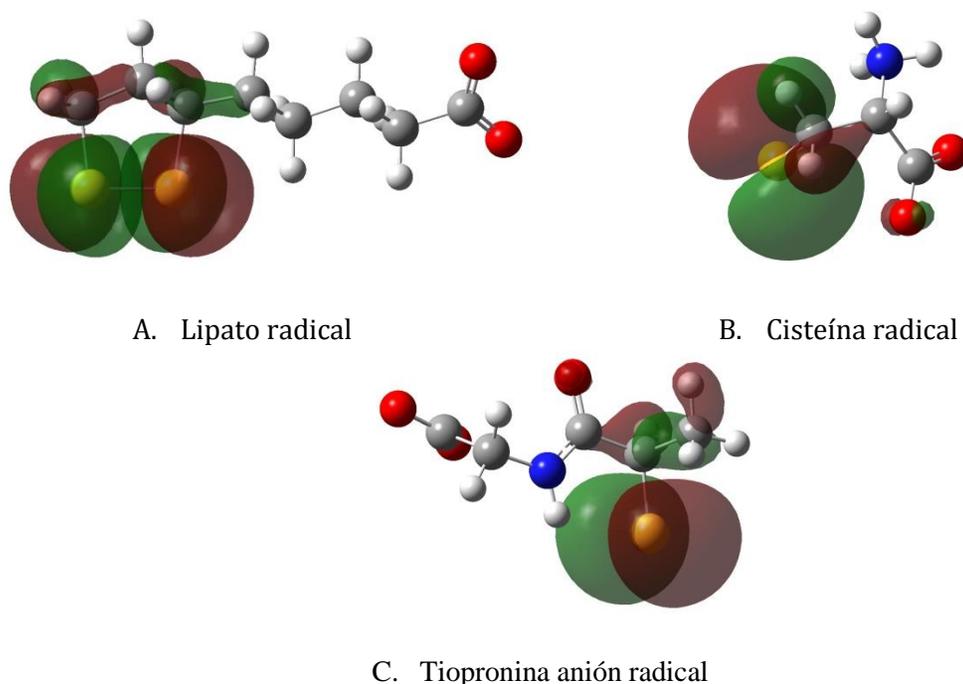


Figura 6.40. Orbitales HOMO en los productos de la transferencia electrónica de antioxidantes.

Si la constante de velocidad con el $\cdot\text{OOH}$ en medio lipídico es usado como criterio de comparación, el ácido dihidrolipoico reacciona casi tan rápido como el Trolox ($3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²² el cual es frecuentemente usado como antioxidante de referencia. Comparado con otros antioxidantes, la actividad atrapadora de radicales peroxilo de este compuesto es menor que los carotenos ($\sim 10^5\text{--}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{123,124} la dopamina ($8.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁵ el canolol ($6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁶ el hidroxitirosol ($6.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁷ el sesamol ($3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁸ y el ácido sinapínico ($1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹²⁹ Esta capacidad es similar a la encontrada en el ácido protocatecuico ($5.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³⁰ capsaicina ($6.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³¹ y α -mangostino ($7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³² y mayor que la del tirosol ($7.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁷ melatonina ($3.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹³³ y cafeína ($3.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹³⁴

En solución acuosa las constantes de velocidad globales del dihidrolipoato con $\text{ROO}\cdot$ son mucho mayores que en medio no polar. Esto es causado principalmente por la influencia del grupo carboxilo. En este medio, el dihidrolipoato reacciona con el $\cdot\text{OOH}$ 1.4×10^3 veces más rápido que el Trolox ($8.96 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹²² Comparado con otros antioxidantes, el dihidrolipoato tiene una capacidad atrapadora de radicales peroxilo mucho mayor que la melatonina ($2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³³ cafeína ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³⁴ alicina ($7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³⁵ tioacroleína ($2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³⁵ y dopamina ($2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);¹²⁵ e incluso mayor que excelentes antioxidantes como el canolol ($2.50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁶ α -mangostino ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³² ácido protocatecuico ($1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³⁰ ácido 2-propenesulfénico ($2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹³⁵ glutatión ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁰ sesamol ($2.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹²⁸ y resveratrol ($5.62 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹³⁶ Sólo el piceatanol ($1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)¹³⁶ tiene una constante de velocidad mayor.

La metodología usada en este trabajo ha sido previamente probada con constantes de velocidad medidas experimentalmente y la desviación máxima entre éstas y las constantes de velocidad teóricas es de un factor de 2, el cual se podría dar entre dos valores experimentales.¹³⁷ Sin embargo, como en cualquier modelo, es necesario comparar los antioxidantes estudiados con valores experimentales. Sólo pocas constantes de velocidad experimentales han sido reportadas para los sistemas estudiados en este trabajo, pero estos pocos valores, nos permiten probar que la metodología usada es correcta para estos sistemas en particular. Hemos mostrado que el ácido lipoico no es un buen antioxidante porque reacciona solamente con radicales muy reactivos como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OCH}_3$, and $\cdot\text{OOCCL}_3$. Esto parecería estar en contradicción con el hecho de que las constantes de velocidad experimentales con el $\cdot\text{OH}$ son mayores con el ácido lipoico que con el ácido dihidrolipoico. Nuestra constante de velocidad calculada para el lipoato con el $\cdot\text{OOCCL}_3$ ($2.26 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) está en excelente acuerdo con el valor experimental ($1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹³⁸ De acuerdo con Packer y col.⁴² el ácido lipoico no atrapa radicales metilperoxilo ni radicales anión superóxido, en este trabajo llegamos a la misma conclusión. Ellos también encuentran que la situación es diferente para el ácido dihidrolipoico, aunque éste es ligeramente menos reactivo con radicales muy reactivos, es capaz de reaccionar con $\cdot\text{OOH}$ y así atrapar, vía equilibrio ácido/base, su base conjugada, el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Éste también atrapa prácticamente cualquier radical, incluyendo los radicales alquilperoxilo. En cuanto a los pocos datos cuantitativos,

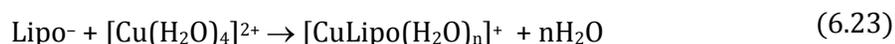
nuestras constantes de velocidad calculadas para $\cdot\text{OOH}/\text{O}_2\cdot^-$, $1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, está en perfecto acuerdo con el valor experimental reportado, $1.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹³⁸

6.2 Formación de complejos con cobre. Reacción del ciclo de Haber-Weiss.

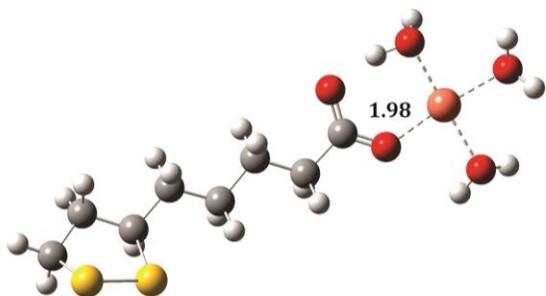
Otra forma en la que los antioxidantes pueden combatir indirectamente especies oxidantes es mediante la formación de complejos de coordinación con metales de transición. Existe una amplia variedad de trazas de metales en los organismos vivos. Para realizar este estudio escogimos al cobre porque está presente en prácticamente todas partes en el cuerpo humano y, aunque es esencial para las funciones apropiadas en la mayoría de los organismos vivos,¹³⁹ también induce la toxicidad celular. Existe evidencia que el cobre puede estar envuelto en la patogénesis de aterosclerosis, en la enfermedad de Alzheimer y otros desórdenes neurodegenerativos.¹⁴⁰ Una de las explicaciones más aceptadas para la toxicidad del cobre es su intervención en la formación de ERO,¹⁴¹ particularmente en el $\cdot\text{OH}$ a través de procesos de óxido reducción.¹⁴⁰ Además se ha propuesto que la quelación con metales puede reducir estos procesos, disminuyendo la formación de las ERO, comparado con las mismas reacciones hechas con los iones libres de cobre.^{142,143}

Para esta parte del estudio se utilizó como centro metálico del complejo de coordinación el Cu (II) que generalmente en solución acuosa, forma complejos de geometría cuadrada plana, por tanto, comenzamos analizando la formación de complejos con esta geometría donde el cobre se encuentra en el centro del cuadrado y los ligantes serán moléculas de agua y el lipoato o el dihidrolipoato. Estos últimos pueden interactuar con el cobre mediante los átomos de oxígeno del grupo carboxílico o por alguno de sus átomos de azufre. Para determinar qué tipo de coordinación del lipoato o del dihidrolipoato con el cobre forma complejos estables calculamos los valores de ΔG^0 (ΔG de formación) para cada posible complejo.

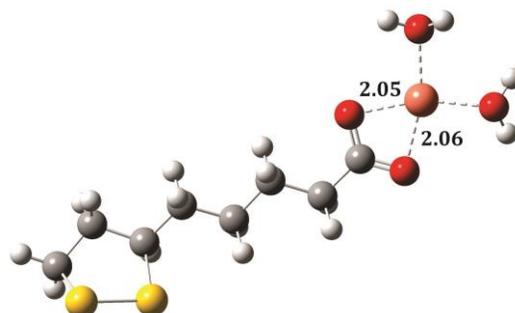
En la figura 6.41 presentamos las posibles estructuras de los complejos entre el cobre y el lipoato, de acuerdo a la siguiente reacción:



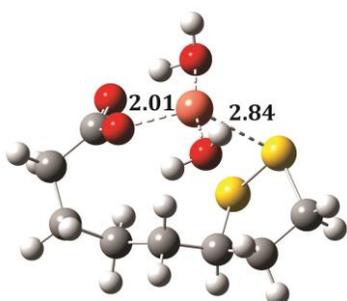
Los valores de ΔG^0 y constantes de formación para los complejos de la figura 6.41 se encuentran en la tabla 6.28. Estos compuestos se presentan comenzando con los que tienen el mayor valor en la constante de formación (K_f).



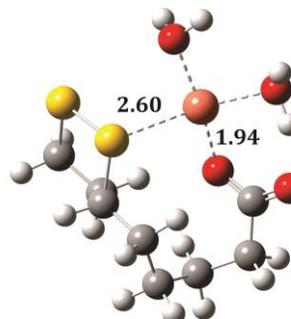
[1] Cu²⁺ - LA⁻ (CO)



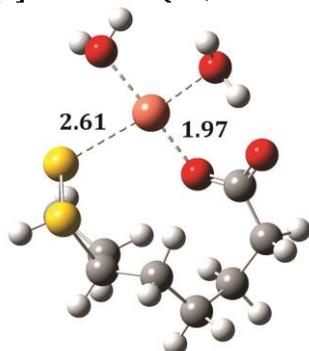
[2] Cu²⁺ - LA⁻ (COO)



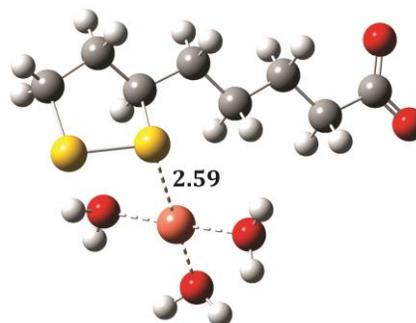
[3] Cu²⁺ - LA⁻ (CO, S2 *trans*)



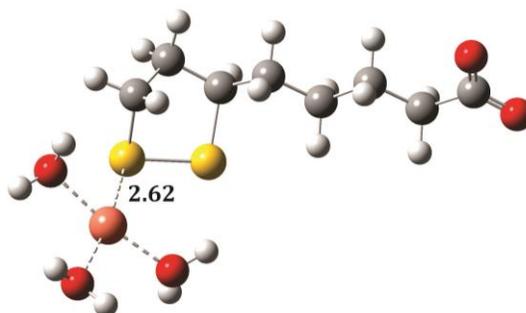
[4] Cu²⁺ - LA⁻ (CO, S1 *cis*)



[5] Cu²⁺ - LA⁻ (CO, S2 *cis*)



[6] Cu²⁺ - LA⁻ (S1)



[7] Cu²⁺ - LA⁻ (S2)

Figura 6.41. Complejos Cu²⁺-Lipoato

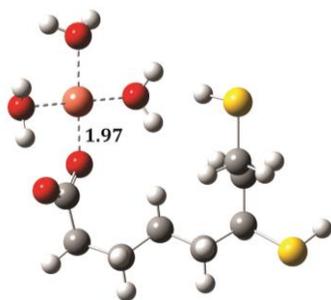
Tabla 6.28. Energía Libre de Gibbs para las reacciones de quelación entre lipoato y Cu²⁺. Solvente=agua.

Complejo [CuLA(H ₂ O) _n] ⁺	$\Delta G_{f_{Cu^{2+}-LA}}$ (kcal/mol)	$K_{f_{Cu^{2+}-LA}}$	$\log K_{f_{Cu^{2+}-LA}}$
[1] Cu ²⁺ - LA ⁻ (CO)	-13.10	4.04 x 10 ⁹	9.61
[2] Cu ²⁺ - LA ⁻ (COO)	-10.25	3.25 x 10 ⁷	7.51
[3] Cu ²⁺ - LA ⁻ (CO, S2 <i>trans</i>)	-0.97	5.16	0.71
[4] Cu ²⁺ - LA ⁻ (CO, S1 <i>cis</i>)	-0.28	1.59	0.20
[5] Cu ²⁺ - LA ⁻ (CO, S2 <i>cis</i>)	1.82	4.06 x 10 ⁻²	-1.34
[6] Cu ²⁺ - LA ⁻ (S1)	10.35	2.57 x 10 ⁻⁸	-7.59
[7] Cu ²⁺ - LA ⁻ (S2)	1.54	1.20 x 10 ⁻¹⁰	-9.92

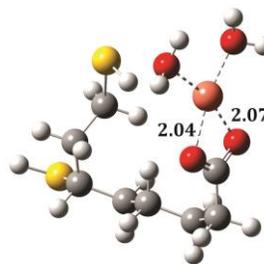
En las etiquetas de las imágenes se encuentran entre paréntesis los grupos del lipoato que se coordinan al cobre, cuando se coordinan dos grupos pueden encontrarse ya sea en posición *cis*, como el complejo [4], o en posición *trans*, es decir, en extremos opuestos del cuadrado que forman los ligantes, como el complejo [3].

En estos resultados vemos que los complejos más estables son aquellos donde los ligantes se coordinan sólo por los átomos de oxígeno del grupo carboxilo, la constante de formación del complejo donde ambos átomos de oxígeno coordinan al cobre es casi cien veces menor a aquel que sólo un oxígeno se coordina. Si comparamos éstos con los complejos bidentados (oxígeno, azufre) observamos que tienen una constante más baja, lo que nos dice que al coordinarse el átomo de azufre al cobre desestabiliza al complejo. Ningunos de los complejos donde el azufre sea el que se coordina supera la estabilidad de los complejos formados sólo con la coordinación del carboxilo. Una tendencia similar a la observada en la formación de complejos lipoato-Cu²⁺ se presenta en la formación de los complejos dihidrolipoato-Cu²⁺ (figura 6.42, tabla 6.29)

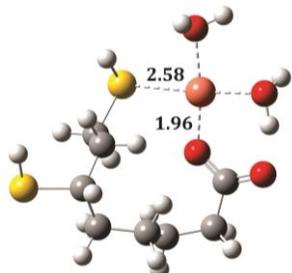




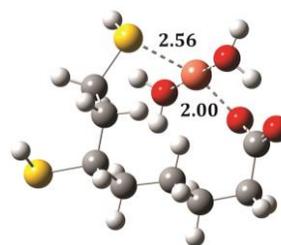
[8] Cu^{2+} - DHLA-SH (CO)



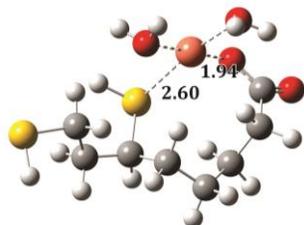
[9] Cu^{2+} - DHL-SH (COO)



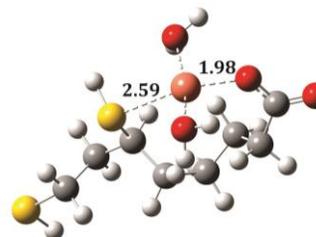
[10] Cu^{2+} - DHLA-SH (CO, S2 *cis*)



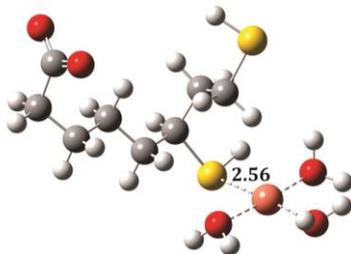
[11] Cu^{2+} - DHLA-SH (CO, S2 *trans*)



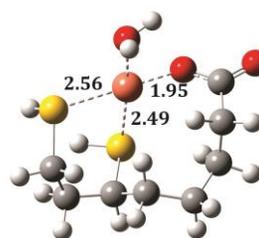
[12] Cu^{2+} - DHLA-SH (CO, S1 *cis*)



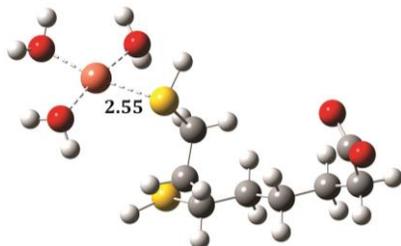
[13] Cu^{2+} - DHLA-SH (CO, S1 *trans*)



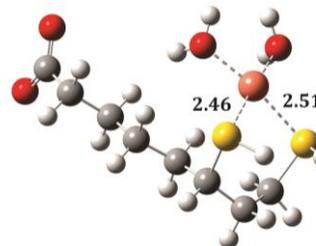
[14] Cu^{2+} - DHLA-SH (S1)



[15] Cu^{2+} - DHLA-SH (CO, S1, S2)



[16] Cu^{2+} - DHLA-SH (S2)



[17] Cu^{2+} - DHLA-SH (S1, S2 *cis*)

Figura 6.42. Complejos Cu^{2+} -Dihidrolipoato

Los complejos más estables se obtienen cuando los átomos de oxígeno son los que interactúan con el cobre. Esto puede deberse a que en el grupo carboxilo se localiza la carga negativa del dihidrolipoato y es ésta la que interactúa con el cobre, que se encuentra cargado positivamente. Esta interacción es más fuerte que la que habría entre el grupo tiol y el cobre.

Tabla 6.29. Energía Libre de Gibbs para las reacciones de quelación entre dihidrolipoato y Cu²⁺.
Solvente=agua.

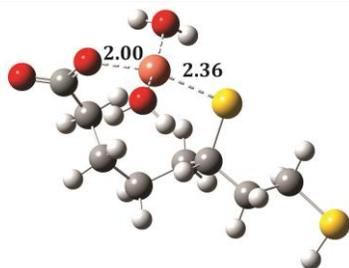
Complejo [CuDHL - SH(H ₂ O) _n] ⁺	$\Delta G_{f_{Cu^{2+}-DHLSH}}$ (kcal/mol)	$K_{f_{Cu^{2+}-DHLSH}}$	$\log K_{f_{Cu^{2+}-DHLSH}}$
[8] Cu ²⁺ - DHLA-SH (CO)	-10.29	3.47 x 10 ⁷	7.54
[9] Cu ²⁺ - DHL-SH (COO)	-7.17	1.80 x 10 ⁵	5.25
[10] Cu ²⁺ - DHLA-SH (CO, S2 <i>cis</i>)	-3.91	7.37 x 10 ²	2.87
[11] Cu ²⁺ - DHLA-SH (CO, S2 <i>trans</i>)	0.72	2.95 x 10 ⁻¹	-0.53
[12] Cu ²⁺ - DHLA-SH (CO, S1 <i>cis</i>)	4.71	3.50 x 10 ⁻⁴	-3.46
[13] Cu ²⁺ - DHLA-SH (CO, S1 <i>trans</i>)	5.04	2.04 x 10 ⁻⁴	-3.69
[14] Cu ²⁺ - DHLA-SH (S1)	11.17	6.48 x 10 ⁻⁹	-8.19
[15] Cu ²⁺ - DHLA-SH (CO, S1, S2)	12.02	1.54 x 10 ⁻⁹	-8.81
[16] Cu ²⁺ - DHLA-SH (S2)	14.29	3.32 x 10 ⁻¹¹	-10.48
[17] Cu ²⁺ - DHLA-SH (S1, S2 <i>cis</i>)	19.47	5.34 x 10 ⁻¹⁵	-14.27

La conclusión que podemos sacar de estos resultados es que dada la estructura de los complejos los átomos de azufre no juegan ningún papel en el acomplejamiento y no serían mejores quelantes que el ácido acético.

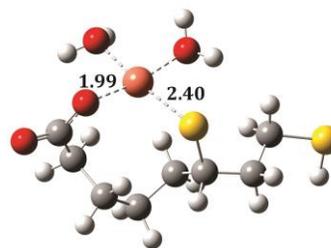
Basándonos en lo anterior, calculamos las constantes de formación para el dihidrolipoato con uno de los grupos tiol desprotonado, es decir, con su forma dianiónica (tablas 6.30 y 6.31) según la siguiente reacción:



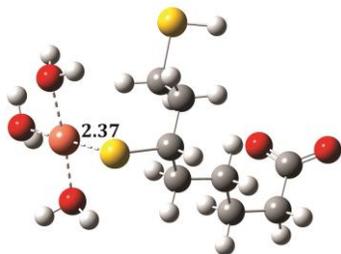
Las estructuras resultantes de los complejos se presentan en la figura 6.43, con el tiol terciario (S1) desprotonado, y en la figura 6.44, donde el tiol secundario (S2) es el que se encuentra desprotonado.



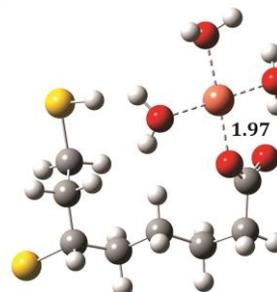
[18] Cu²⁺ - DHLA-S1- (CO, S1 *trans*)



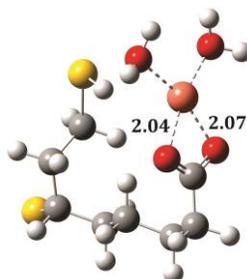
[19] Cu²⁺ - DHLA-S1- (CO, S1 *cis*)



[20] Cu²⁺ - DHLA-S1- (S1)



[21] Cu²⁺ - DHLA-S1- (CO)



[22] Cu²⁺ - DHLA-S1- (COO)

Figura 6.43. Complejos Cu²⁺ con DHL-S²⁻ (S1 desprotonado)

Tabla 6.30. Complejos Cu²⁺ con DHL-S²⁻ (S1 desprotonado)

Complejo [CuDHL - S(H ₂ O) _n]	$\Delta G_{f_{Cu^{2+}-DHLs}}$ (kcal/mol)	$K_{f_{Cu^{2+}-DHLs}}$	$\log K_{f_{Cu^{2+}-DHLs}}$
[18] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (CO, S1 <i>trans</i>)	-19.27	1.34 x 10 ¹⁴	14.13
[19] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (CO, S1 <i>cis</i>)	-17.86	1.24 x 10 ¹³	13.09
[20] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (S1)	-14.05	2.01 x 10 ¹⁰	10.30
[21] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (CO)	-11.05	1.26 x 10 ⁸	8.10
[22] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (COO)	-8.10	8.74 x 10 ⁵	5.94

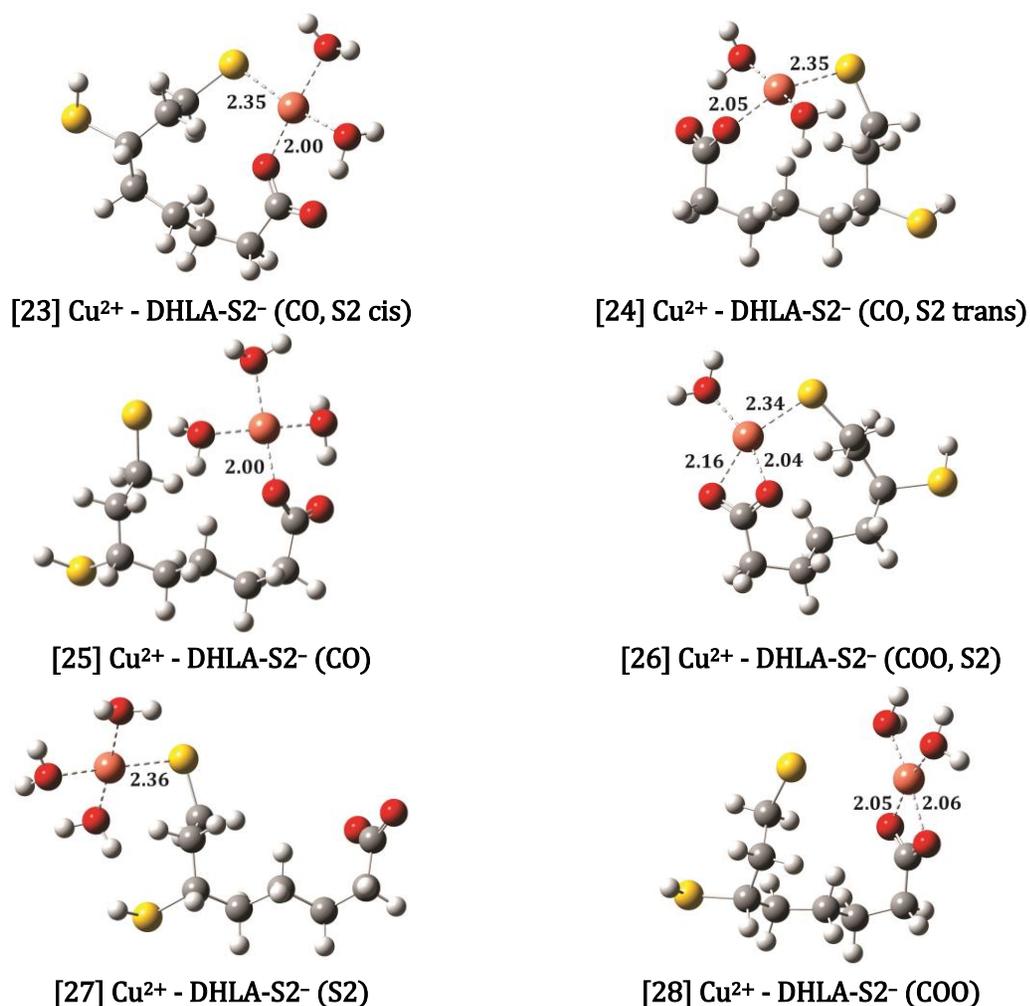


Figura 6.44. Complejos Cu²⁺ con DHL-S₂⁻ (S₂ desprotonado)

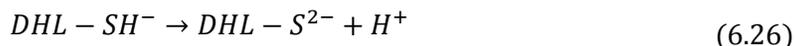
Tabla 6.31. Complejos Cu²⁺ con DHL-S₂⁻ (S₂ desprotonado)

Complejo [CuDHL - S(H ₂ O) _n]	$\Delta G_{f_{Cu^{2+}-DHL}}$ (kcal/mol)	$K_{f_{Cu^{2+}-DHL}}$	$\log K_{f_{Cu^{2+}-DHL}}$
[23] Cu ²⁺ - DHLA-S ₂ ⁻ (CO, S ₂ cis)	-26.26	1.79 x 10 ¹⁹	19.25
[24] Cu ²⁺ - DHLA-S ₂ ⁻ (CO, S ₂ trans)	-22.76	4.85 x 10 ¹⁶	16.69
[25] Cu ²⁺ - DHLA-S ₂ ⁻ (CO)	-22.54	3.33 x 10 ¹⁶	16.52
[26] Cu ²⁺ - DHLA-S ₂ ⁻ (COO, S ₂)	-18.55	3.99 x 10 ¹³	13.60
[27] Cu ²⁺ - DHLA-S ₂ ⁻ (S ₂)	-13.81	1.33 x 10 ¹⁰	10.12
[28] Cu ²⁺ - DHLA-S ₂ ⁻ (COO)	-8.70	2.38 x 10 ⁶	6.38

Con la forma dianiónica del ácido dihidrolipoico los complejos de coordinación con el cobre (II) más estables son aquellos donde participan tanto el carboxilato como el grupo tiol

desprotonado. Los complejos formados con el dihidrolipoato donde S2 está desprotonado (tabla 6.31) son más estables que con S1 desprotonado (tabla 6.30).

Con estos nuevos cálculos es necesario determinar si la energía de formación de los complejos con los grupos tiol desprotonados compensa la energía necesaria para desprotonar el grupo tiol, puesto que, a pH = 7.4, el ácido dihidrolipoico dianiónico se encuentra en proporción muy baja. Para calcular el valor en la constante de formación de los complejos de Cu²⁺ con la forma dianiónica del ácido dihidrolipoico debemos tener en cuenta la reacción de desprotonación del grupo tiol,



cuya constante de equilibrio es:

$$K_a = \frac{[DHL - S^{2-}][H^+]}{[DHL - SH^-]} = e^{-\Delta G^0/RT} \quad (6.27)$$

y, por tanto, el pK_a de este grupo cuyo valor experimental es 10.7.

$$-\log K_a = pK_a = \frac{\Delta G^0}{2.303RT} \quad (6.28)$$

La K_a corresponde a condiciones estándar, es decir, concentración 1 M y pH = 0. Sin embargo, estamos interesados en este proceso a condiciones fisiológicas, pH=7.4. Bajo estas condiciones [H⁺] = 10^{-pH} = 3.98 x 10⁻⁸ M y podemos definir una constante de equilibrio condicional, K', de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K' = K_a[H^+] = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}} (10^{-pH}) = e^{-\frac{-\Delta G'}{RT}} \quad (6.29)$$

Como resultado, la Energía Libre de reacción a cualquier amortiguador de pH será:

$$\Delta G' = \Delta G - 2.303RT(pH) \quad (6.30)$$

Teniendo el valor de pK_a este valor de Energía Libre de Reacción condicional puede calcularse de la siguiente forma:

$$\Delta G' = (pK_a - pH)2.303RT \quad (6.31)$$

Aplicando la ecuación 6.31, la energía necesaria para desprotonar el dihidrolipoato a pH=7.4 es de 4.45 kcal, esta energía la sumamos al ΔG⁰ en los complejos de las tablas 6.30 y 6.31 y, con estos nuevos valores calculamos las constantes de formación. Estas constantes se presentan en las tablas 6.32 y 6.33.

Tabla 6.32. Constantes globales para los complejos de Cu²⁺ con DHL-S²⁻ (S1 desprotonado) considerando el equilibrio ácido-base del dihidrolipoato.

Complejo [CuDHL – S(H ₂ O) _n]	$\Delta G_{f_{Cu^{2+}-DHLS}}$ (kcal/mol)	$K_{f_{Cu^{2+}-DHLS}}$	$\log K_{f_{Cu^{2+}-DHLS}}$
[18] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (CO, S1 trans)	-14.77	6.71 x 10 ¹⁰	10.83
[19] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (CO, S1 cis)	-13.36	6.23 x 10 ⁹	9.79
[20] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (S1)	-9.55	1.01 x 10 ⁷	7.00
[21] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (CO)	-6.55	6.31 x 10 ⁴	4.80
[22] Cu ²⁺ - DHLA-S1- (COO)	-3.60	4.38 x 10 ²	2.64

Tabla 6.33. Constantes globales para los complejos de Cu²⁺ con DHL-S²⁻ (S2 desprotonado) considerando el equilibrio ácido-base del dihidrolipoato.

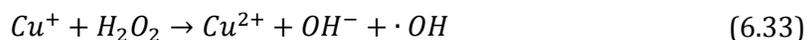
Complejo [CuDHL – S(H ₂ O) _n]	$\Delta G_{f_{Cu^{2+}-DHLS}}$ (kcal/mol)	$K_{f_{Cu^{2+}-DHLS}}$	$\log K_{f_{Cu^{2+}-DHLS}}$
[23] Cu ²⁺ - DHLA-S2- (CO, S2 cis)	-21.76	9.00 x 10 ¹⁵	15.95
[24] Cu ²⁺ - DHLA-S2- (CO, S2 trans)	-18.26	2.43 x 10 ¹³	13.39
[25] Cu ²⁺ - DHLA-S2- (CO)	-18.04	1.67 x 10 ¹³	13.22
[26] Cu ²⁺ - DHLA-S2- (COO, S2)	-14.05	2.00 x 10 ¹⁰	10.30
[27] Cu ²⁺ - DHLA-S2- (S2)	-9.31	6.65 x 10 ⁶	6.82
[28] Cu ²⁺ - DHLA-S2- (COO)	-4.20	1.19 x 10 ³	3.08

Los valores de las constantes de las tablas 6.32 y 6.33 son mayores a los que se obtuvieron con los complejos formados a partir del dihidrolipoato, con el cual el complejo más estable tiene un valor en su constante de formación de 3.47 x 10⁷ y corresponde a aquel donde el dihidrolipoato se coordina con el Cu²⁺ solamente por medio de uno de los oxígenos del grupo carboxilato.

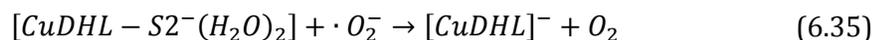
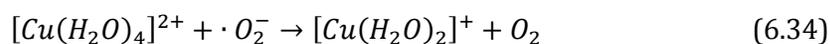
A partir del complejo más estable de Cu²⁺ con ácido dihidrolipoico dianiónico estudiamos la reacción de reducción de cobre mediada con superóxido radical, la cual se lleva a cabo mediante un mecanismo de transferencia electrónica. La reacción de forma general es:



La cual corresponde al primer paso del ciclo de Haber-Weiss. El siguiente paso es una reacción tipo Fenton (6.33). Este último paso describe la formación de radicales muy reactivos (\cdot OH), por lo que una manera de reducir su producción es reduciendo la velocidad de la reacción 6.32.



Por tanto, calculamos la constante de velocidad de la reacción 6.32 utilizando el complejo más estable formado entre el Cu^{2+} y el ácido dihidrolipoico, es decir, el complejo [23]. Comparamos este valor con el de la constante de velocidad del Cu^{2+} solvatado únicamente. Esto con la intención de analizar si el ácido dihidrolipoico, al formar complejos con el Cu^{2+} , reduce la velocidad de la reacción inicial del ciclo de Haber Weiss.



De acuerdo a las reacciones 6.34 y 6.35 los productos formados serán complejos de Cu^+ . El complejo más estable formado con cobre (I) y la forma dianiónica del ácido dihidrolipoico se muestra en la figura 6.45.

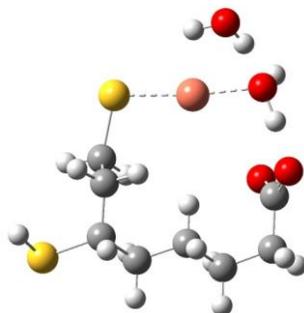


Figura 6.45. Complejo de coordinación formado entre Cu^+ y la forma dianiónica del ácido dihidrolipoico.

La constante de velocidad de la reacción 6.35 fue calculada considerando cada átomo de cobre coordinado únicamente con moléculas de agua y con la misma geometría tomada en los complejos con dihidrolipoato, es decir, geometría cuadrada plana para el Cu^{2+} y geometría lineal para el Cu^+ .



Figura 6.46. Geometrías optimizadas para los iones de Cu^{2+} y Cu^+ solvatados.

Los valores de la Energía libre de Gibbs de reacción, Energía libre de Gibbs de activación y constantes de velocidad para las reacciones 6.34 y 6.35 se muestran en la tabla 6.34.

Tabla 6.34. Energía libre de Gibbs de reacción (ΔG°), energía libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger) y constantes de velocidad (k) para la reacción inicial del ciclo de Haber-Weiss.

Reacción	ΔG° (kcal/mol)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($M^{-1} s^{-1}$)
(21)	-3.91	6.39	1.291×10^8
(22)	-1.01	9.10	1.33×10^6

De acuerdo a los resultados presentados en esta tabla, el complejo formado entre Cu^{2+} y dihidrolipoato reducen en dos órdenes de magnitud la constante de velocidad para la reacción inicial del ciclo de Haber-Weiss. En conclusión, el ácido dihidrolipoico formará complejos con el cobre (II) en condiciones fisiológicas, en los cuales, el átomo de azufre desprotonado participa en la coordinación con el cobre, además, es un buen candidato para reducir la formación de radicales $\cdot OH$. Mientras que el ácido lipoico solo formará los complejos con el cobre (II) al coordinarse con el grupo carboxilato, por lo que no se espera que tenga ningún efecto sobre la reactividad de este, al menos no mayor que cualquier ácido carboxílico.

6.3 Reparación de proteínas con dihidrolipoato

Finalmente, si el daño hecho por radicales libres a moléculas de importancia biológica como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos no puede ser prevenido, los antioxidantes pueden actuar como reparadores de los radicales formados. En este trabajo, para estudiar la reparación de radicales centrados en carbono en proteínas utilizamos la N-formil-leucinamida como modelo. Éste tipo de modelo ha sido utilizando tanto experimentalmente (para la N-formil-tirocinamida y la N-formil-triptofaninamida) como teóricamente para una serie de residuos de aminoácidos incluida la N-formil-leucinamida.^{144,145}

Geometría.

La N-formil-leucinamida (figura 6.47) muestra dos enlaces peptídicos. Los ángulos diedro están orientados para simular una alfa hélice y los extremos del esqueleto están delimitados, por un lado, con el grupo ácido (COH) y, por el otro, por el grupo amino (NH_2). La leucina es la cadena lateral unido al átomo $C\alpha$ del aminoácido central. Estudiaremos la reparación de los radicales que son producto del daño, por radicales libres, a esta cadena lateral incluyendo al átomo del carbono alfa, $C\alpha$, aunque se ha demostrado que este último es el sitio donde se produce el menor daño. Por tanto, tenemos cuatro radicales que pueden ser reparados, los cuales hemos denominado como α , β , γ y δ , estos son mostrados en la Figura 6.48. Todos son radicales centrados en carbono y de geometría trigonal plana.

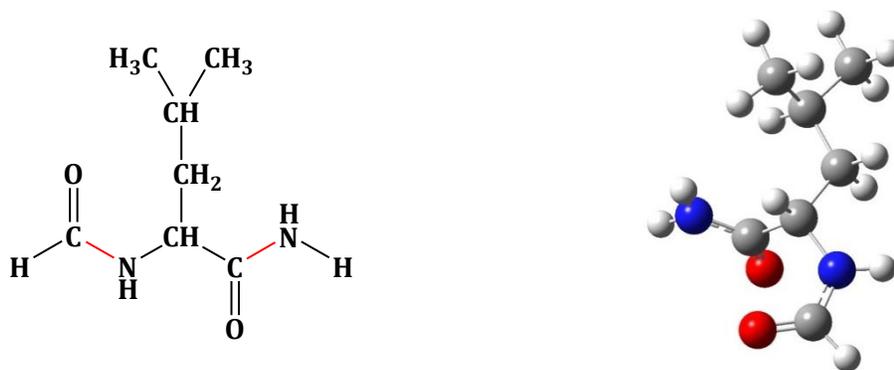


Figura 6.47. N-formil-leucinamida

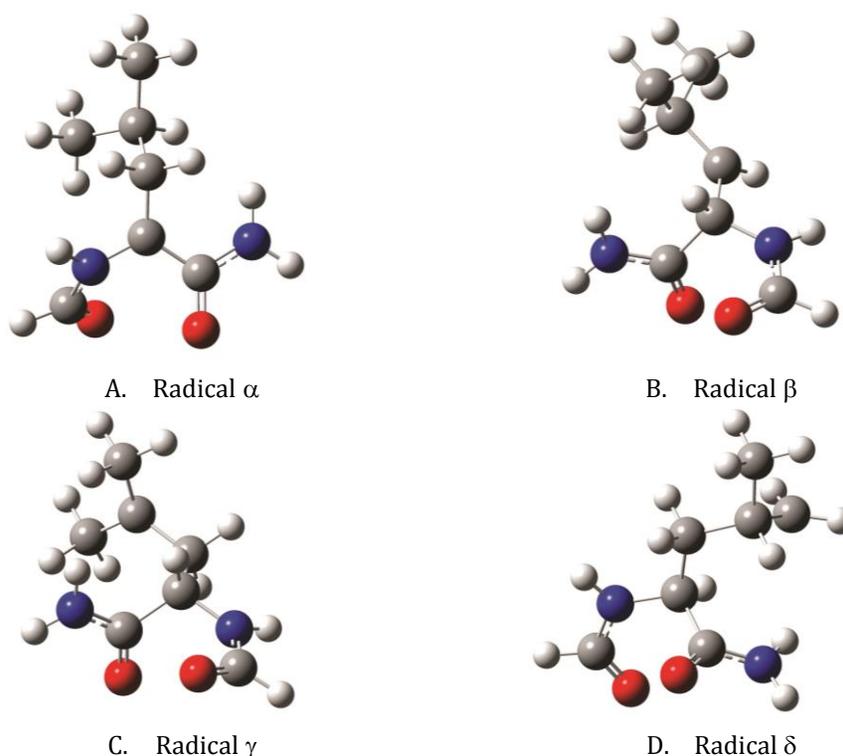


Figura 6.48. Radicales de la N-formil-leucinamida, producto del daño por radicales libres.

Utilizamos el dihidrolipoato para la reparación de los radicales modelos de proteína. El dihidrolipoato puede llevar a cabo la reparación mediante la transferencia del hidrógeno de cualquiera de sus dos grupos tiol, terciario (S1) y secundario (S2), que, como se probó en la sección 6.1.1, son las reacciones favorecidas termodinámica y cinéticamente. Así, las reacciones a estudiar son:



Los productos que las reacciones 6.36–6.43 originan son la N-formil-leucinamida y los radicales centrados en azufre del dihidrolipoato (figura 6.6, H e I)

Estudio termodinámico.

Al estudiar la reacción de transferencia de hidrógeno para la reparación de proteínas, encontramos que todas las reacciones son exergónicas (tabla 6.35). La reparación con S1 proporciona valores de ΔG° mayores que la reparación con S2, esto nos dice que el radical del dihidrolipoato al ceder el protón de S(1) es más estable, en 0.63 kcal/mol, que el formado por la transferencia de hidrógeno en S(2). Dado que la energía libre de reacción para la reparación en alfa es menos exergónica, esperamos que la reparación del radical en esta posición sea la más lenta, ya que se trata del radical más estable. Por otro lado, la reparación en delta sería la más rápida, pues es éste el radical menos estable, es decir, por ser un radical más reactivo, se espera que la reacción de transferencia de hidrógeno sea más rápida. En forma general, la tendencia que presentan los valores de ΔG° es: $\delta > \beta > \gamma > \alpha$.

Tabla 6.35. Energía Libre de Gibbs de reacción (ΔG° , kcal/mol), energía Libre de Gibbs de activación (ΔG^\ddagger , kcal/mol) y constantes de velocidad (k , $M^{-1} s^{-1}$) para la N-formil-leucinamida, a 298.15 K.

Radical	ΔG°	ΔG^\ddagger	k	k_{ap}
<i>Reparado con S1</i>				
α	-6.36	11.29	7.63×10^4	7.63×10^4
β	-16.14	7.99	1.74×10^7	1.73×10^7
γ	-11.27	7.65	1.53×10^7	1.52×10^7
δ	-16.97	6.00	1.48×10^9	9.15×10^8
<i>Reparado con S2</i>				
α	-5.73	9.96	3.08×10^5	3.08×10^5
β	-15.51	3.09	6.78×10^{10}	2.28×10^9
γ	-10.65	4.67	2.36×10^9	1.16×10^9
δ	-16.35	5.89	1.79×10^{10}	1.03×10^9

Estudio cinético.

Las estructuras optimizadas para los estados de transición correspondientes a las reacciones de reparación con S1 y S2 se ilustran en las figuras 6.49 y 6.50, respectivamente.

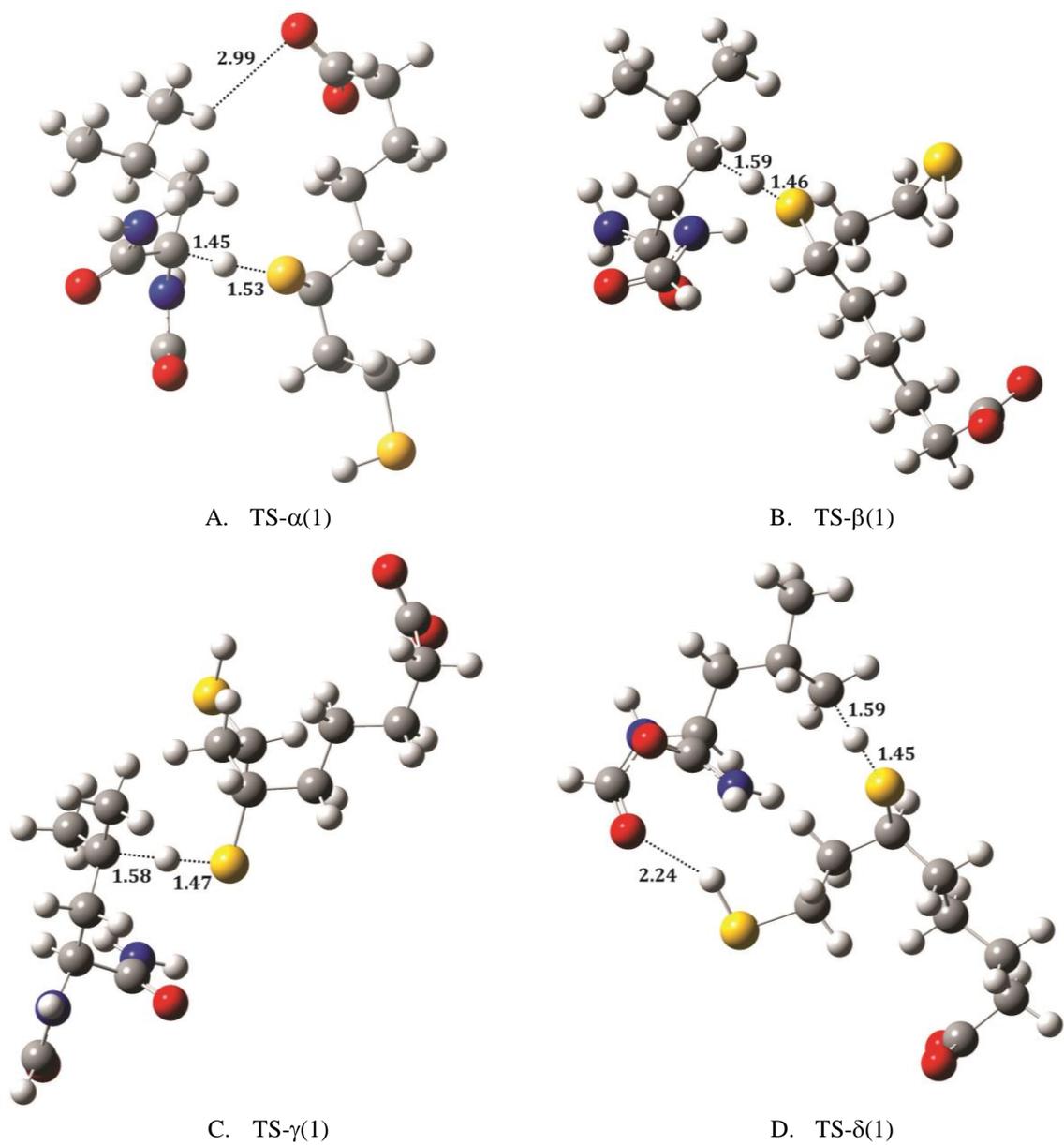


Figura 6.49. Geometrías optimizadas para las reacciones de reparación con S1

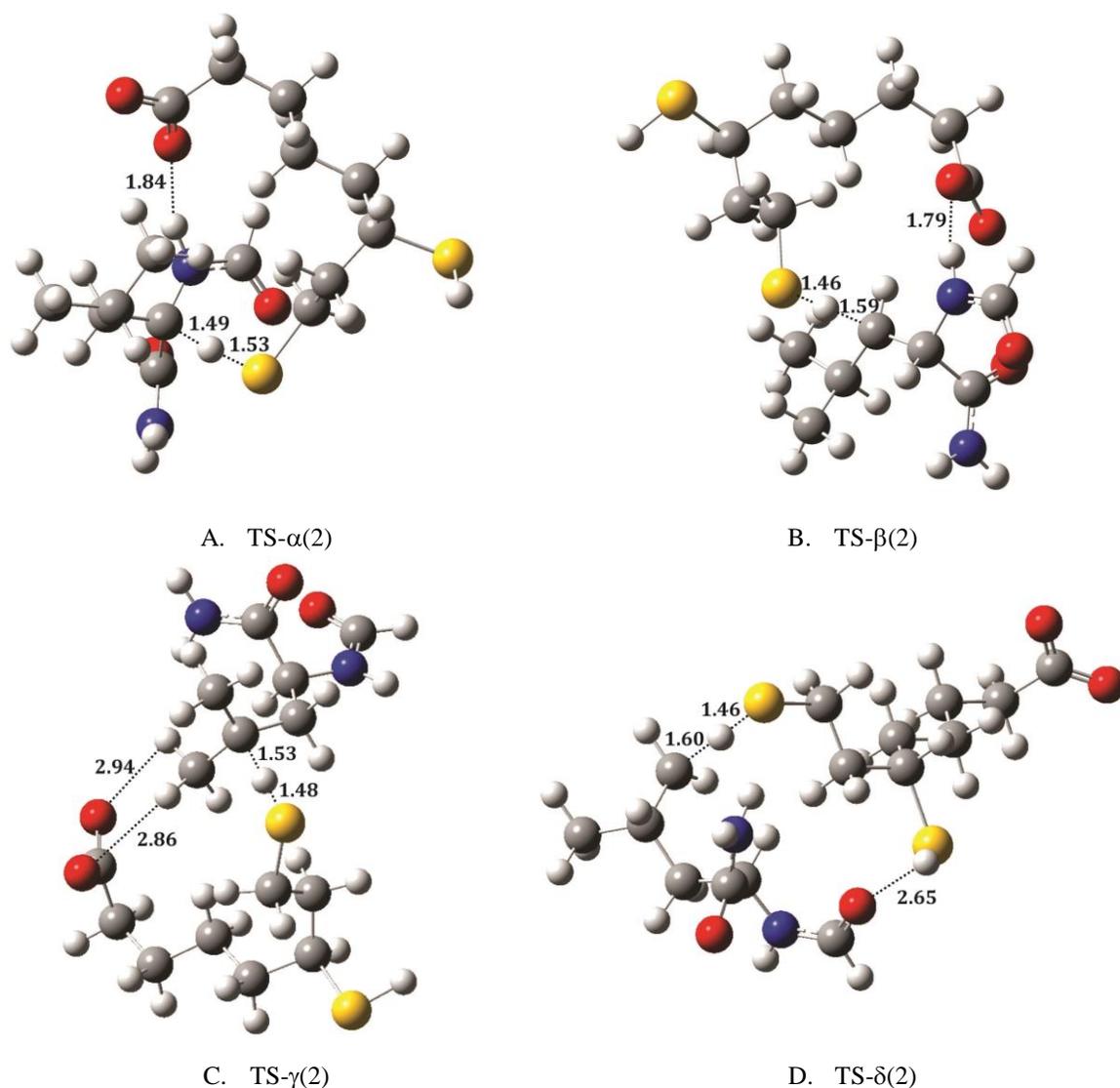


Figura 6.50. Geometrías optimizadas para las reacciones de reparación con S2

Los valores en la energía libre de Gibbs de activación, así como los valores en las constantes de velocidad de las reacciones de reparación se encuentran en la tabla 6.35. En esta se puede observar que los valores de ΔG^\ddagger para la reparación con S2 son menores que para aquella con S1, en todos los canales de reacción y en ambos modelos, a pesar de que el radical, producto de la abstracción del hidrógeno en S1, es más estable. Dado que la diferencia en reactividad de los dos grupos tiol del dihidrolipoato no es demasiado grande, podemos atribuir las diferencias en los valores de ΔG^\ddagger sólo a factores estéricos y a interacciones tipo puente de hidrógeno o dipolo-dipolo entre el grupo carboxilo del dihidrolipoato y la proteína.

Los valores de ΔG^\ddagger dan como resultados valores en las constantes de velocidad muy altos, con excepción de la reparación en la posición alfa, que según resultados previos no se forma porque a pesar de que es termodinámicamente favorecido, su velocidad de formación está

muy limitado por factores estereo-electrónicos.¹⁴⁶ La mayoría de estas constantes de velocidad se encuentran cerca o dentro del límite por difusión. En todos los casos la reparación en la posición alfa es la más lenta. Por tanto, las siguientes comparaciones en cuanto a reactividad solo se harán entre los radicales en las posiciones beta, gamma y delta.

La secuencia en reparación según los valores de las constantes de velocidad es la siguiente:

Reparada con S1: delta > beta ≈ gama

Reparada con S2: beta > gama ≈ delta

Los valores en las constantes de velocidad en la reparación con S1 revelan que los sitios son reparados de acuerdo a la reactividad de los radicales a reparar en la leucina, es decir, el radical de la leucina dañado en delta que es el más reactivo es el que se repara más rápido, casi 100 veces más rápido que los radicales en beta y gamma. Un comportamiento similar se espera para las reacciones de reparación con S(2), sin embargo esto no ocurre. La reparación del radical en beta de la leucina se repara con una velocidad dos veces mayor que los radicales en gamma y delta. Esto podemos atribuirlo a la interacción tipo puente de hidrógeno existente entre el grupo carboxilo del dihidrolipoato y el hidrogeno N-H que forma parte del esqueleto de nuestro modelo de proteína.

Si analizamos las constantes de velocidad globales (Tabla 6.36), según la ecuación:

$$k_{\text{global}} = k_{\text{reparada con S(1)}} + k_{\text{reparada con S(2)}} \quad (6.44)$$

encontramos que el dihidrolipoato repara en todas las posiciones (excepto en alfa) con la misma velocidad, prácticamente, la cual se encuentra dentro del límite por difusión.

Tabla 6.36. Constantes de velocidad globales (k , $M^{-1} s^{-1}$) para la N-formil-leucinamida, a 298.15 K.

Reacción	k ($M^{-1} s^{-1}$)
DHL + radical α	3.85×10^5
DHL + radical β	2.30×10^9
DHL + radical γ	1.17×10^9
DHL + radical δ	1.94×10^9

De acuerdo a esta última tabla, el dihidrolipoato es un antioxidante que es capaz de reparar radicales alifáticos con la misma velocidad con los que pueden ser formados: Beta > delta > gama > alfa.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir:

El ácido lipoico, por sí mismo, no es un buen antioxidante primario porque éste no depura radicales poco reactivos y de larga vida media, los cuales son muy importantes en los procesos de estrés oxidativo. Por otra parte, el ácido dihidrolipoico es un excelente antioxidante capaz de atrapar casi cualquier radical centrado en oxígeno, así también como a otros de reactividad similar. Mientras que el ácido lipoico es un donador de electrones que es capaz de reaccionar con radicales muy electrofílicos, el ácido dihidrolipoico es un excelente donador de átomos de hidrógeno que reacciona esencialmente por medio de la transferencia de hidrógeno.

Aunque es importante conocer cuál de los dos, el ácido lipoico o el ácido dihidrolipoico, es el que actúa como antioxidante en los organismos vivos, es importante mencionar que, *in vivo*, ambos están en equilibrio por medio de reacciones bioquímicas. Los resultados de este trabajo ilustran la necesidad de estudiar a detalle la velocidad de interconversión de uno en otro con el fin de saber cuál es el favorecido en el equilibrio. Sólo si las concentraciones de ácido dihidrolipoico son importantes y la interconversión es rápida, sería relativamente poco importante cuál forma es consumida.

El ácido dihidrolipoico es uno de los pocos antioxidantes que es capaz de reaccionar con radicales $\cdot\text{OOH}$ a velocidades del orden de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y es el único, a nuestro conocimiento, que reacciona tan rápido por medio de transferencia de hidrógeno. Esto es debido a la estructura del ácido dihidrolipoico donde los grupos $-\text{SH}$ y $-\text{COO}$ tienen una distancia ideal para atrapar los radicales $\cdot\text{OOH}$ y transferir el átomo de hidrógeno, lo cual puede ser comparado a la forma en que el sitio activo de las enzimas trabaja, es decir, el catalizador está cerca del sitio reactivo en un lugar perfecto.

De la misma forma que el ácido dihidrolipoico, la cisteína zwitteriónica y la tiopronina aniónica, los cuales tienen al menos un grupo tiol, reaccionan preferentemente por abstracción de hidrógeno de este grupo con radicales libres de diferente reactividad. La cisteína aniónica y la tiopronina dianiónica, aunque se encuentran en menor porcentaje a pH 7.4 que sus respectivos compuestos protonados, reaccionan por transferencia electrónica con constantes de velocidad controladas por difusión.

Además de tener una excelente capacidad antioxidante primaria, el ácido dihidrolipoico en medio acuoso, puede ayudar a depurar el cobre de los organismos vivos al formar complejos de coordinación. Los complejos más estables con Cu^{2+} se forman con el dihidrolipoato cuando alguno de los grupos tiol se encuentra desprotonado. Estos complejos se forman al interaccionar el cobre tanto con el grupo carboxilato como con el tiol desprotonado del dihidrolipoato. La geometría que estos complejos adquieren es cuadrada plana. Los complejos formados entre el dihidrolipoato y el cobre en estado de oxidación 2+ disminuyen cien veces la constante de velocidad para la reacción inicial del ciclo de Haber-Weiss, ayudando a evitar la formación de radicales $\cdot\text{OH}$.

El dihidrolipoato repara eficazmente los radicales centrados en carbono del residuo de leucina en la N-formil-leucinamida. La velocidad de reparación está controlada por difusión en todas las posiciones excepto en la posición alfa.

La metodología usada en este estudio probó ser válida para el estudio de cualquier tipo de velocidades de reacción de ERO con antioxidantes y, por tanto, de su capacidad antioxidante, lo cual permite ser un excelente complemento para los estudios experimentales. Las conclusiones en este trabajo están en perfecto acuerdo con los pocos valores experimentales, con la exactitud esperada de los resultados experimentales y cálculos teóricos.

8. APÉNDICE

Diagramas de distribución de especies.

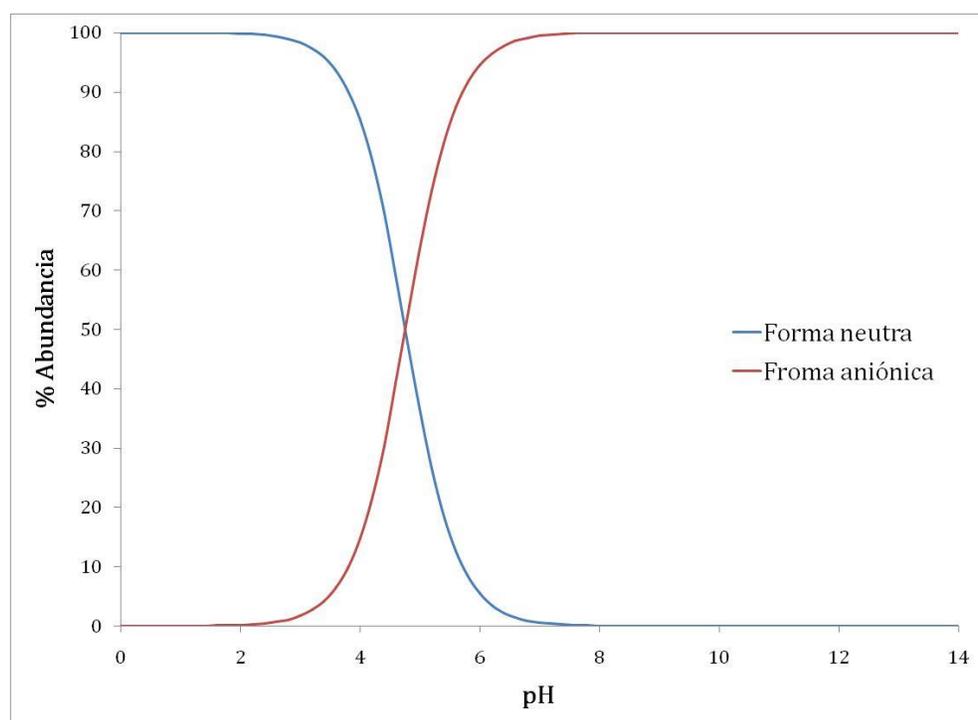
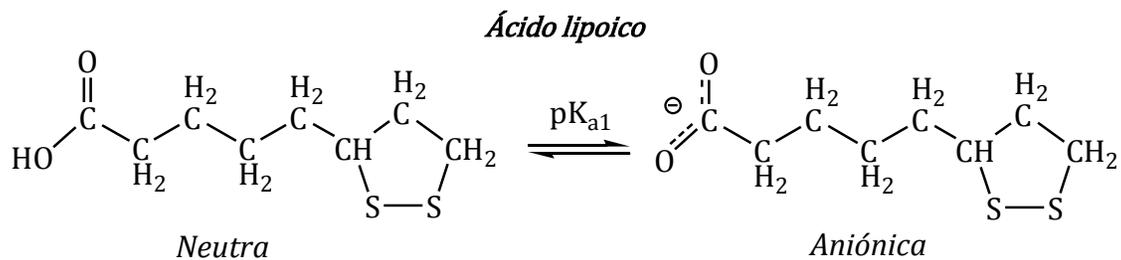


Figura A.1. Porcentaje de formación de especies del ácido lipoico en función del pH.

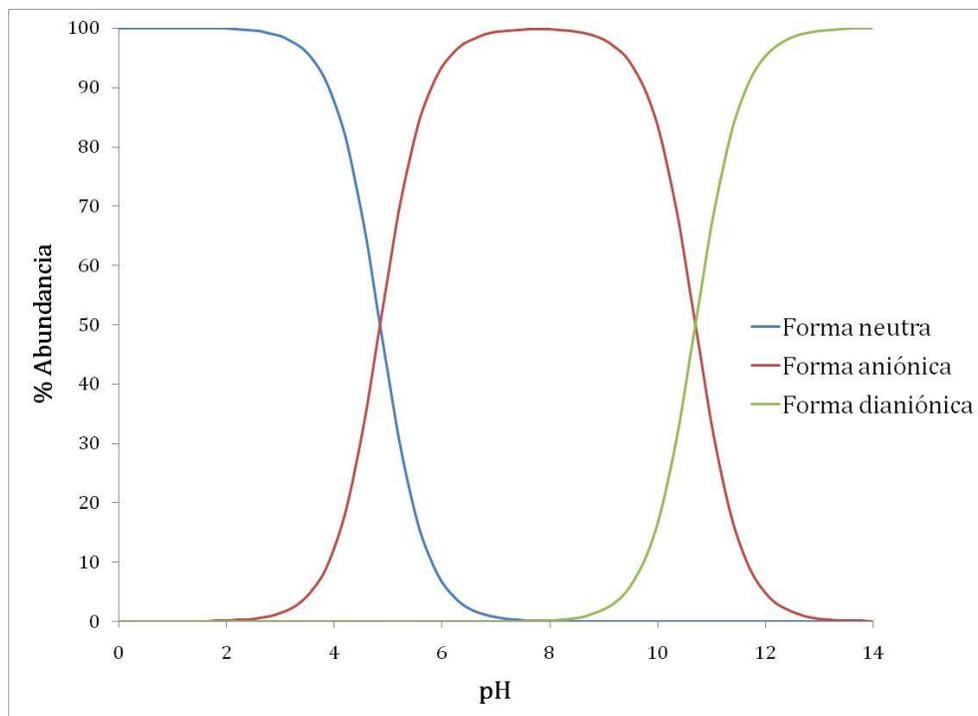
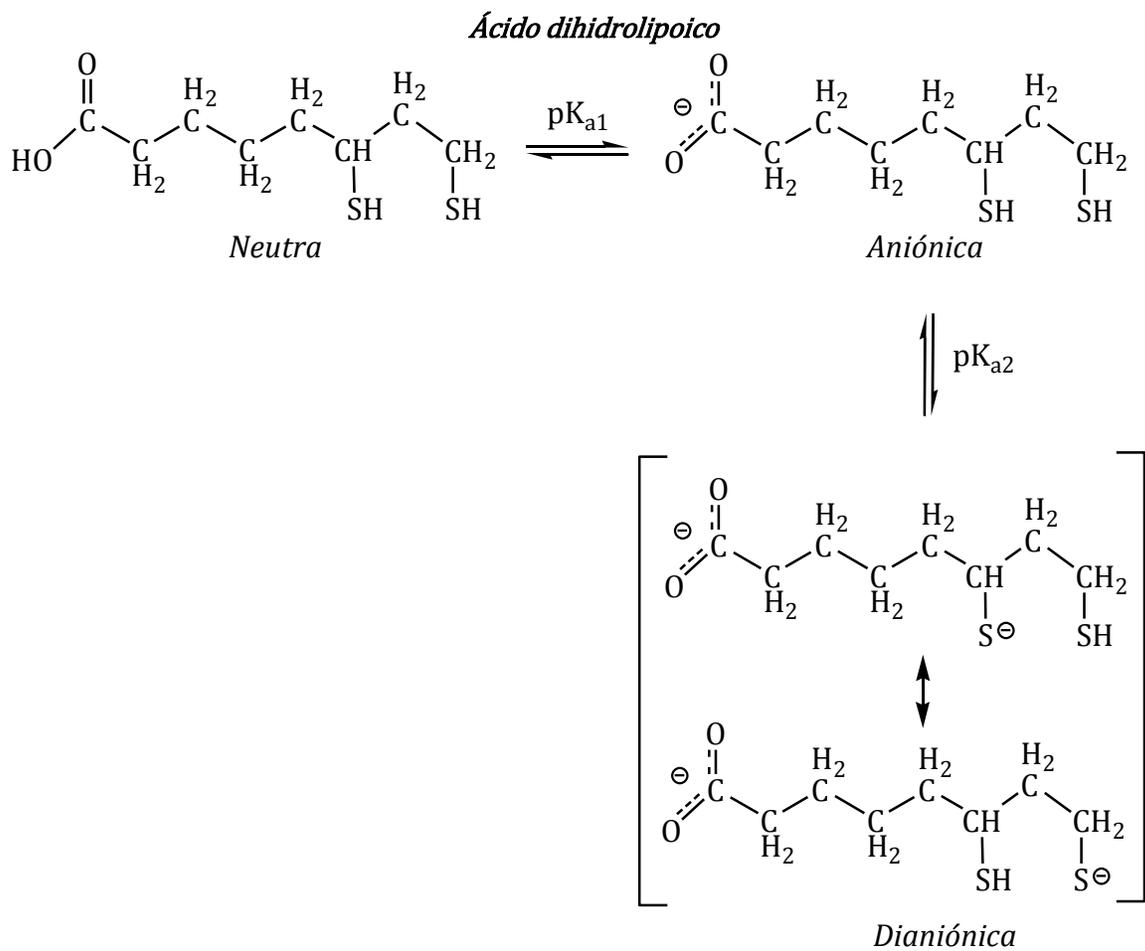


Figura A.2. Porcentaje de formación de especies del ácido dihidrolipoico en función del pH.

Cisteína

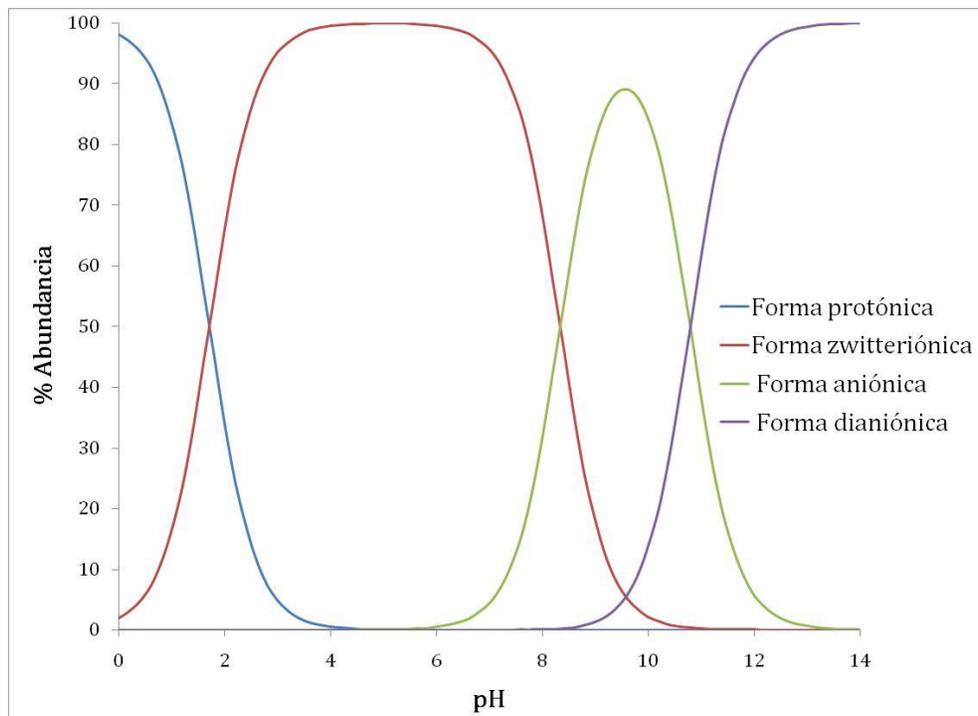
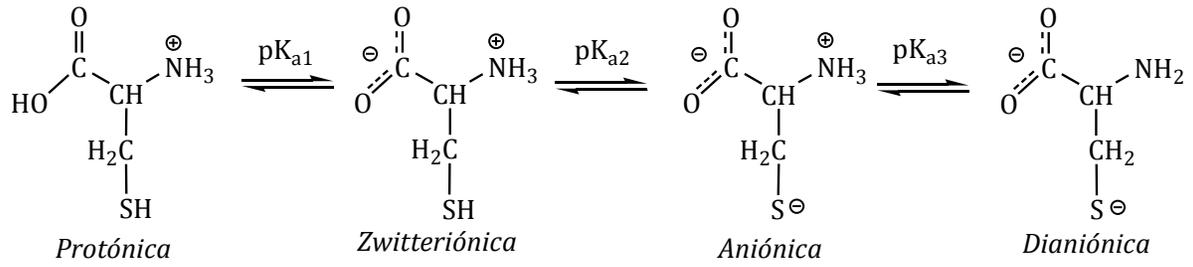


Figura A3. Porcentaje de formación de especies de la cisteína en función del pH.

Tiopronina

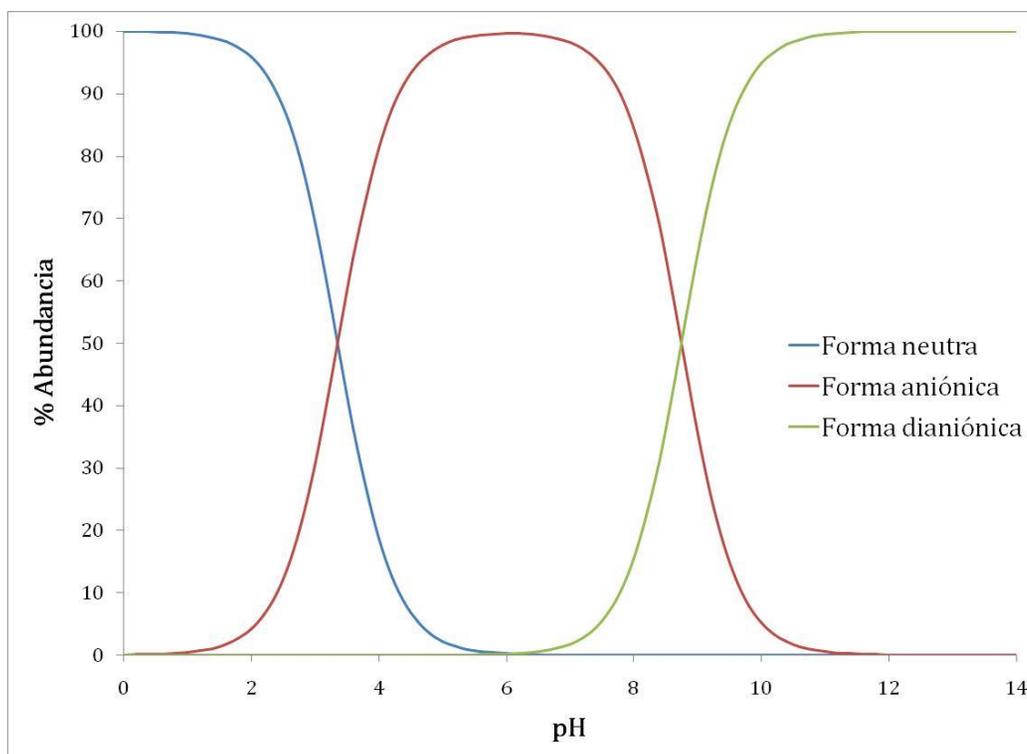
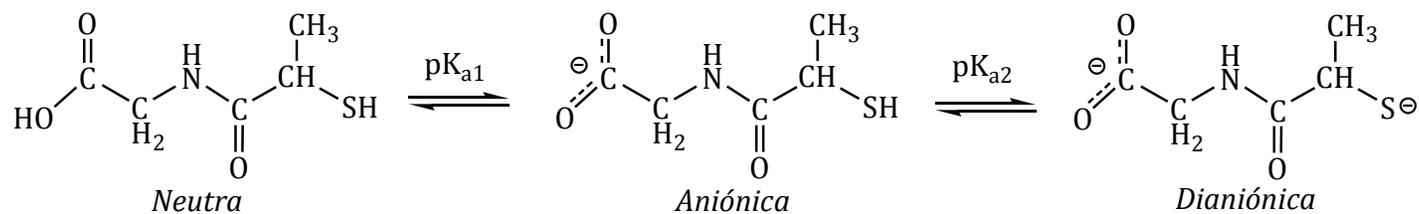


Figura A4. Porcentaje de formación de especies de la tiopronina en función del pH.

9. REFERENCIAS

- ¹Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. y Milner, J. A. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2007**, 18, 567.
- ²Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. y Mazur, M. *Chemico-Biological interactions*. **2006**, 160, 1.
- ³Brewer, G. J. *Experimental Biology and Medicine*. **2007**, 232, 323.
- ⁴Davies, M. J. Oxidative damage to proteins. In: Chatgililoglu C, Studer A (eds). *Encyclopedia of radicals in chemistry, Biology, and Materials*. Chichester, UK. John Wiley and Sons Ltd. 2012.
- ⁵Schuessler H., Schilling K. *International Journal of Radiation Biology*. **1984**, 45, 267.
- ⁶Cohen, A. J. Mori-Sánchez, P. y Yang, W. *Chemical Reviews*. **2012**, 112, 289.
- ⁷Hohenstein, E. G. Chill, S. T. y Sherrill, C. D. *Journal of Chemical Theory and Computational*. **2008**, 4, 1996.
- ⁸Riley, K. E., Pitoňák, M., Jurečka, P., y Hobza, P. *Chemical Reviews*. **2010**, 110, 5023.
- ⁹Ferrighi, L., Pan, Y., Grönbeck, H. y Hammer, B. *Journal of Physical Chemistry*. **2012**, 116, 7374.
- ¹⁰Zhao, Y., Schultz, N. E. y Truhlar, D. G. *Journal of Physical Chemistry*. **2005**, 123, 161103.
- ¹¹Zhao, Y., y Truhlar, D. G. *Theoretical Chemistry Accounts*. **2008**, 120, 215.
- ¹²W. F. Libby. *Journal of Physical Chemistry*. **1952**, 56, 863.
- ¹³Marcus, R., Zwolinski, y Eyring, *Journal of Physical Chemistry*. **1954**, 58, 432.
- ¹⁴Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. y Mazur, M. *Chemico-Biological interactions*. **2006**, 160, 1.
- ¹⁵Brewer, G. J. *Experimental Biology and Medicine*. **2007**, 232, 323.
- ¹⁶Angel, I., Bar, A., Horovitz, T., Taler, G., Krakovsky, M., Resnitsky, D., y col. *Drug Development and Research*. **2002**, 56, 300.
- ¹⁷Perry, G., Cash, A. D., Srinivas, R. y Smith, M. A. *Drug Development and Research*. **2002**, 56, 293.
- ¹⁸Stohs, S. y Bagchi, D. *Free Radical Biology and Medicine*. **1995**, 18, 321.
- ¹⁹Park, S. y Imlay, J. A. *Journal of Bacteriology*. **2003**. 185, 1942.
- ²⁰Gerschman, R. *Science*. **1954**, 119, 623.
- ²¹Harman, D. *J. Gerontol.* **1956**, 11, 298.
- ²²Dröge, W. *Physiological Reviews*. **2002**, 82, 48.
- ²³Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. y Milner, J. A. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2007**, 18, 567.
- ²⁴Rice-Evans, C., Miller, N. y Paganga, G. *Trends in Plant Science*. **1997**, 2, 152.
- ²⁵Battin, E. E. y Brumaghim, J. L. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2008**, 102, 3036.
- ²⁶Battin, E. E., Perron, N. R. y Brumaghim, J. L. *Inorganic Chemistry*. **2006**, 45, 499.
- ²⁷Mates, J. M., Perez-Gomez, C. y Nuñez de Castro, I. *Clinical Biochemistry*. **1999**, 32, 595.
- ²⁸Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H. et al. *Journal of the American College of Nutrition*. **2003**, 22, 18.
- ²⁹Burton, G. W. *Annual Review of Nutrition*. **1990**, 10, 357.
- ³⁰Atmaca, G. *Yonsei Medical Journal*. **2004**, 45, 776.
- ³¹Parcell, S. *Alternative Medicine Review*. **2002**, 7, 22.
- ³²Fleischauer, A. T. y Arab, L. *Journal of Nutrition*. **2001**, 131, 1032S.
- ³³Sha, S. H. y Schacht, J. *Hearing Research*. **2000**, 142, 34.
- ³⁴Unnikrishnan, M. K. y Rao, M. N. A. *Inflammation Research*. **1990**, 31, 110.
- ³⁵Brosnan, J. T. y Brosnan, M. E. *Journal of Nutrition*. **2006**, 136, 1636S.
- ³⁶Huang, D., Zhang, Y., Qi, Y., Chen, C. y Ji, W. *Toxicology Letters*. **2008**, 179, 43.

-
- ³⁷Penugonda, S., Mare, S., Goldstein, G., Banks, W. A. y Ercal, N. *Brain Research*. **2005**, 1056, 132.
- ³⁸Smith, C. V., Jones, D. P., Guenther, T. M., Lash, L. H. y Lauterburg, B. H. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **1996**, 140, 1.
- ³⁹Cooper, G. J. S., Chan, Y. K., Dissanayake, A. M. y col. *Diabetes*. **2005**, 54, 1468.
- ⁴⁰Jones, D. P. *Rejuvenation Research*. **2006**, 9, 169.
- ⁴¹Jones, D. P. *Antioxidants and Redox Signaling*. **2005**, 111, 2973.
- ⁴²Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J. *Free Radical Biology and Medicine*. **1995**, 19, 227.
- ⁴³Fotakis, G., y Timbrell, J. A. *Toxicology in Vitro*. **2006**, 20, 641.
- ⁴⁴Venugopal, D., Zahid, M., Mailander, P. C., Meza, J. L., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., y col. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **2008**, 109, 22.
- ⁴⁵Song, D., Hutchings, S., y Pang, C. C. *European Journal of Pharmacology*. **2005**, 508, 205.
- ⁴⁶Kaufmann, Y., Spring, P., y Klimberg, V. S. *Nutrition*. **2008**, 24, 462.
- ⁴⁷Wassef, R., Haenold, R., Hansel, A., Brot, N., Heinemann, S. H., y Hoshi, T. *Journal of Neuroscience*. **2007**, 27, 12808.
- ⁴⁸de Melo Reis, R. A., Herculano, A. M., da Silva, M. C., dos Santos, R. M., y do Nascimento, J. L. *Neuroscience Research*. **2007**, 58, 278.
- ⁴⁹Ito, T., Kimura, Y., Uozumi, Y., Takai, M., Muraoka, S., Matsuda, T., y col. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **2008**, 44, 927.
- ⁵⁰Pinto, J. T., y Rivlin, R. S. *Journal of Nutrition*. **2001**, 131, 1058S.
- ⁵¹Shukla, Y., y Kalra, N. *Cancer Letters*. **2007**, 247, 167.
- ⁵²Li, H., Li, H. Q., Wang, Y., Xu, H. X., Fan, W. T., Wang, M. L. y col. *Chinese Medical Journal*. **2004**, 117, 1155.
- ⁵³Powolny, A. A., y Singh, S. V. *Cancer Letters*. **2008**, 269, 305.
- ⁵⁴Yeh, C.-C., Hou, M.-F., Wu, S.-H., Tsai, S.-M., Lin, S.-K., Hou, L. A. y col. *Cell Biochemistry and Function*. **2006**, 24, 555.
- ⁵⁵Estrela, J. M., Ortega, A., y Obrador, E. *Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science*. **2006**, 43, 143.
- ⁵⁶Balendiran, G. K., Dabur, R., y Fraser, D. *Cell Biochemistry and Function*. **2004**, 22, 343.
- ⁵⁷Zeevalk, G. D., Razmpour, R., y Bernard, L. P. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. **2008**, 62, 236.
- ⁵⁸Bharath, S., Cochran, B. C., Hsu, M., Liu, J., Ames, B. N., y Andersen, J. K. *Neurotoxicology*. **2002**, 23, 479.
- ⁵⁹Bermejo, P., Martin-Aragon, S., Benedi, J., Susin, C., Felici, E., Gil, P. y col. *Free Radical Research*. **2008**, 42, 162.
- ⁶⁰Pensalfini, A., Cecchi, C., Zampagni, M., Becatti, M., Favilli, F., Paoli, P. y col. *Free Radical Biology and Medicine*. **2008**, 44, 1624.
- ⁶¹Ceperkovic, Z. *Medicinski Pregled*. **2006**, 59, 143.
- ⁶²Pfanzaql, B., Tribl, F., Koller, E., y Moslinger, T. *Atherosclerosis*. **2003**, 168, 39.
- ⁶³Breitkreutz, R., Pittack, N., Nebe, C. T., Schuster, D., Brust, J., Beiche. *Journal of Molecular Medicine*. **2000**, 78, 55.
- ⁶⁴Patrick, L. *Alternative Medicine Review*. **2006**, 11, 114.
- ⁶⁵Streeper, R. S., Henriksen, E. J., Jacob, S. y col. *American Journal Physiology*. **1997**, 273, E185.
- ⁶⁶Jacob, S., Streeper, P. S., Fogt, D. L. y col. *Diabetes*. **1996**, 45, 1024.
- ⁶⁷Konrad, T., Vicini, P., Kusterer, K. y col. *Diabetes Care*. **1999**, 22, 280.
- ⁶⁸Mishra, O. P., Pooniya, V., Ali, Z., Upadhyay, R. S., y Prasad, R. *Pediatric Nephrology*. **2008**, 23, 2047.
- ⁶⁹Kim, J. M., Chang, H. J., Kim, W. K., Chang, N., y Chun, H. S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 6547.

-
- ⁷⁰Ates, B., Abraham, L., y Ercal, N. *Free Radical Research*. **2008**, 42, 372.
- ⁷¹Matsugo, S., Konishi, T., Marsuo, D. y col. *Biochemistry Biophysics Communication Research*. **1996**, 227, 216.
- ⁷²Ala, A., Walker, A. P., Ashkan, K., Dooley, J. S., y Schilsky, M. L. *Lancet*. **2007**, 369, 397.
- ⁷³Leone, N., Courbon, D., Ducimetiere, P., y Zureik, M. *Epidemiology*. **2006**, 17, 308.
- ⁷⁴Battin, E. E., y Brumaghim, J. L. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2008**, 102, 3036.
- ⁷⁵Miyoshi, K., Sugiura, Y., Ishizu, K., Iitaka, Y., y Nakamura, H. *Journal of the American Chemical Society*. **1980**, 102, 6130.
- ⁷⁶McAuliffe, C. A., Quagliano, J. V., yVallarino, L. M. *Inorganic Chemistry*. **1966**, 5, 1996.
- ⁷⁷Sze, Y. K., Davis, A. R., y Neville, G. A. *Inorganic Chemistry*. **1970**, 14,1969.
- ⁷⁸Shindo, H., y Brown, T. L. *Journal of the American Chemical Society*. **1965**, 87, 1904.
- ⁷⁹Livingstone, S. E., & Nolan, J. D. *Inorganic Chemistry*. **1968**, 7, 1447.
- ⁸⁰Halliwell, B. *Free Radical Research*. **1996**, 25, 57.
- ⁸¹Vilar-Rojas, C., Guzman-Grenfell, A. M., Hicks, J. J. *Archives of Medical Research*. **1996**, 27, 1.
- ⁸²Davies, K. J., Goldberg, A. L. *Journal of Biological Chemistry*. **1987**, 262, 8227.
- ⁸³Meucci, E., Mordente, A., Martorana, G. E. *Journal of Biological Chemistry*. **1991**, 266, 4692.
- ⁸⁴Dean, R. T., Wolff, S. P., McElligott, M. A. *Free Radical Research. Communications*. **1989**, 7, 97.
- ⁸⁵Hoey, B. M., Butler, J. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1984**, 791, 212.
- ⁸⁶Domazou, A. S., Koppenol, W. H., Gebicki, J. M. *Free Radical Biology and Medicine*. **2009**, 46, 1049.
- ⁸⁷Gebicki, J. M. In: Pietzsch, J., editor. *Protein Oxidation and Disease*. Trivandrum: Research Signpost; 2006. pp 7.
- ⁸⁸Nauser, T., Koppenol, W. H., Gebicki, J. M. *Biochemical Journal*. **2005**, 392, 693.
- ⁸⁹Gebicki, J. M., Nauser, T., Domazou, A., Steimann, D., Bounds, P. L., Koppenol, W. H. *Amino Acids*. **2010**, 39, 1131.
- ⁹⁰Folkes, L. K., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Radi, R., Wardman, P. *Archives of Biochemistry Biophysics*. **2011**, 506, 242.
- ⁹¹Francisco-Marquez, M. y Galano, A. *Journal of Physical Chemistry B*. **2009**, 113, 4947.
- ⁹²Galano, A. y Francisco-Marquez, M. *Journal of Physical Chemistry B*. **2009**, 113, 16077.
- ⁹³Galano, A. y Álvarez-Idaboy, J. R. *RSC Advances*. **2011**, 1, 1763.
- ⁹⁴Álvarez-Idaboy, J. R. y Galano, A. *Journal of Physical Chemistry B*. **2012**, 116, 9316.
- ⁹⁵Vega-Rodríguez, A. y Alvarez-Idaboy, J. R. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2009**, 11, 7649.
- ⁹⁶Zavala-Oseguera, C., Alvarez-Idaboy, J. R., Merino, G. y Galano, A. *Journal of Physical Chemistry A*. **2009**, 113, 13913.
- ⁹⁷Galano, A., Francisco-Marquez, M. y Alvarez- Idaboy, J. R. *Journal of Physical Chemistry B*. **2011**, 115, 8590.
- ⁹⁸Galano, A., Alvarez- Idaboy J. R. y Francisco-Marquez, M. *Journal of Physical Chemistry B*. **2011**, 115, 13101.
- ⁹⁹Maldonado, P. D., Alvarez-Idaboy, J. R., Aguilar-González, A., Lira-Rocha, A., Jung-Cook, H., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J. y Galano, A. *Journal of Physical Chemistry B*. **2011**, 115, 13408.
- ¹⁰⁰Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Journal of Computational Chemistry*. **2013**, 34, 2430.
- ¹⁰¹Gaussian 09, Revision A.02M. 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. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov,R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C.Burant, S. S.

- Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. 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, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- ¹⁰²Velez, E., Quijano, J., Notario, R., Pabón, E., Murillo, J., Leal, J., Zapata, E. y Alarcón, G. *Journal of Physical Organic Chemistry*. **2009**, 22, 971
- ¹⁰³Black, G. y Simmie, J. M. *Journal of Computational Chemistry*. **2010**, 31, 1236.
- ¹⁰⁴Furuncuoğlu, T., Ugur, I., Degirmenci, L. y Aviyente, V. *Macromolecules*. **2010**, 43, 1823.
- ¹⁰⁵Okuno, Y. *Chem.—Eur. J.* **1997**, 3, 212.
- ¹⁰⁶Benson, S. W. *The Foundations of Chemical Kinetics*; McGraw-Hill: New York, 1960; pp 504508.
- ¹⁰⁷Ardura, D.; Lopez, R.; Sordo, T. L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 23618.
- ¹⁰⁸H. Eyring, *Journal of Chemical Physics*. **1935**, 3, 107.
- ¹⁰⁹M. G. Evans and M. Polanyi, *Trans. Faraday Soc.* **1935**, 31, 875.
- ¹¹⁰D. G. Truhlar, W. L. Hase and J. T. Hynes, *Journal of Physical Chemistry*. **1983**, 87, 2664.
- ¹¹¹D. G. Truhlar and A. Kuppermann, *Journal of the American Chemical Society*. **1971**, 93, 1840.
- ¹¹²Eckart, C. *Physical Review*. **1930**, 35, 1303.
- ¹¹³Marcus, R. A. *Review of Modern Physics*. **1993**, 65, 599.
- ¹¹⁴Marcus, R. A. *Pure and Applied Chemistry*. **1997**, 69, 13.
- ¹¹⁵F. C. Collins and G. E. Kimball, *Journal of Colloid Science*. **1949**, 4, 425.
- ¹¹⁶M. Smoluchowski, *Z. Physical Chemistry*. **1917**, 92, 129.
- ¹¹⁷(a) A. Einstein, *Annals of Physics*. (Leipzig), **1905**, 17, 549;
(b) G. G. Stokes, *Mathematical and Physical Papers*, Cambridge University Press, Cambridge, 1903, Vol. 3 (esp. Sect.).
- ¹¹⁸Rose, R. C.; Bode, A. M. *FASEB J.* **1993**, 7, 1135–1142.
- ¹¹⁹Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. *J. Pineal Res.* **2011**, 51, 1–16.
- ¹²⁰Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *RSC Adv.* **2011**, 1, 1763–1771.
- ¹²¹Scott, B. C., Aruoma, O. I., Evans, P. J.; O'Neill, C.; van der Vliet, A.; Cross, C. E.; Tritschler, H.; Halliwell, B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad. Res.* **20**:119–133; 1994.
- ¹²²Alberto, M. E.; Russo, N.; Grand, A.; Galano, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 4642–4650.
- ¹²³Galano, A.; Francisco-Márquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 11338–11345.
- ¹²⁴Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, 127, 595–603.
- ¹²⁵Iuga, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Vivier-Bunge, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 12234–12246.
- ¹²⁶Galano, A.; Francisco-Márquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 8590–8596.
- ¹²⁷Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Marquez, M.; Medina, M. E. *Theor. Chem. Acc.* **2012**, 131, 1173.
- ¹²⁸Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Marquez, M. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 13101–13109.
- ¹²⁹Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 11199–11205.
- ¹³⁰Galano, A.; Pérez-González, A. *Theor. Chem. Acc.* **2012**, 131, 1265.
- ¹³¹Galano, A.; Martínez, A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 1200–1208.
- ¹³²Martínez, A.; Galano, A.; Vargas, R. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 12591–12598.
- ¹³³Galano, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 7178–7188.
- ¹³⁴León-Carmona, J. R.; Galano, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 4538–4546.

-
- 135 Galano, A.; Francisco-Márquez, M. J. *Phys. Chem. B* **2009**, 113, 16077–16081.
- 136 Cordova-Gomez, M.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *RSC Adv.* **2013**, 3, 20209–20218.
- 137 Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Comput. Chem.* **2013**, 34, 2430–2445.
- 138 Suzuki, Y. J.; Tsuchiya, M.; Packer, L. *Free Radical Res. Commun.* **1991**, 15, 255–263.
- 139 Andrews, N. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 6543-6545.
- 140 Brewer, G. L. *Exp. Biol. Med.* **2007**, 232, 323-335.
- 141 Gaetke, L. M. y Chow, C. K. *Toxicology.* **2003**, 189, 147-163.
- 142 Bentes, A. L. A., Borges, R. S., Monteiro, W. R., de Macedo, L. G. M., y Alves, C. N. *Molecules.* **2001**, 16, 1749-1760.
- 143 Kabanda, M. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 2153-2166.
- 144 Watts, Z. I.; Easton, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11323-11325.
- 145 Nukuna, B. N.; Goshe, M. B.; Anderson, V. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1208-1214.
- 146 M. E. Medina, A. Galano and J. R. Alvarez-Idaboy. *Pys. Chem. Chem. Phys* 2015

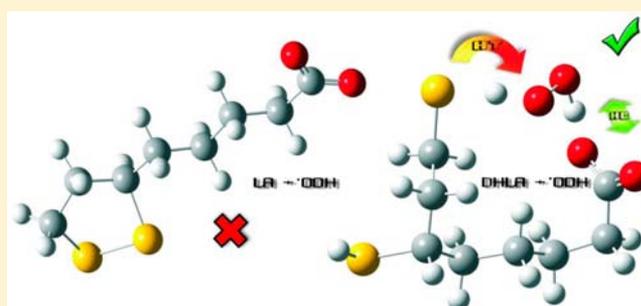
Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. A Comprehensive Theoretical Study of Their Antioxidant Activity Supported by Available Experimental Kinetic Data

Romina Castañeda-Arriaga and J. Raul Alvarez-Idaboy*

Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av Universidad 3000, Copilco Universidad, Coyoacán, Ciudad de México DF 04510, México

S Supporting Information

ABSTRACT: The free radical scavenging activity of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHHLA) has been studied in nonpolar and aqueous solutions, using the density functional theory and several oxygen centered radicals. It was found that lipoic acid is capable of scavenging only very reactive radicals, while the dehydrogenated form is an excellent scavenger via a hydrogen transfer mechanism. The environment plays an important role in the free radical scavenging activity of DHHLA because in water it is deprotonated, and this enhances its activity. In particular, the reaction rate constant of DHHLA in water with an HOO^\bullet radical is close to the diffusion limit. This has been explained on the basis of the strong H-bonding interactions found in the transition state, which involve the carboxylate moiety, and it might have implications for other biological systems in which this group is present.



INTRODUCTION

Lipoic acid (LA) is an endogen organosulfur compound that plays an essential role in the metabolism as a cofactor for several mitochondrial enzymes.^{1,2} It can be synthesized enzymatically from octanoic acid and ingested with food mainly from meat, although it can be found in lesser amounts in fruits and vegetables.^{3,4} LA is better known than its reduced form, dihydrolipoic acid (DHHLA). In vivo they are interconverted via enzymatic redox reactions.⁵ Both free LA and DHHLA have been detected in cells after administration of LA.⁵ Therefore, it is not evident which one is the biologically active form, particularly for functions that have not been explicitly studied. Most endogenously produced LA is not free, because its precursor, octanoic acid, is bound to enzyme complexes prior to the enzymatic insertion of sulfur atoms. Accordingly, for functions other than cofactor, LA or DHHLA are obtained from the diet.

It has been reported that both forms (LA and DHHLA) have antioxidant properties.^{6–9} In chemical experiments in which reduction of LA to DHHLA is not expected, LA scavenges both hydroxyl radicals and singlet oxygen, but it has been shown to be incapable of protecting linoleic acid from AAPH-induced oxidation.¹⁰ DHHLA, on the other hand, is capable of protecting linoleic acid under the same conditions. This and other tests allowed Zhao et al. to conclude that DHHLA is a better antioxidant than LA. However, the ability to scavenge $\bullet\text{OH}$ and other very reactive oxidants like $^1\text{O}_2$ does not necessarily mean that a certain compound can be classified as an antioxidant, because almost any biological molecule can react with $\bullet\text{OH}$ radicals at diffusion controlled rates. In fact $\bullet\text{OH}$ reactions

having rate constants smaller than $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ are exceptions.¹¹ Unfortunately, this is not common knowledge and should be studied more in detail.

Suzuki et al.¹² found that both LA and DHHLA are capable of scavenging $\bullet\text{OH}$ radicals, but only DHHLA is capable of scavenging superoxide radical anions with a rate constant of $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This result implies that DHHLA is an excellent antioxidant, and that is very important because $\text{O}_2^{\bullet-}$ is a relatively mild oxidant that is therefore much more selective and can be useful to discriminate between the antioxidant capacities of different substrates.

LA and DHHLA are considered amphiphilic molecules, and they are soluble in both polar and nonpolar environments, a desired property of antioxidants because it means they can act in cytosol as well as in the lipid membrane.

In the last years we have been involved in the development of a theoretical methodology that uses quantum chemistry and statistical thermodynamics methods to obtain rate constants of radical-molecule reactions, known as QM-ORSA.¹³ In most cases the rate constants calculated with this methodology are in excellent agreement with experimental values for a wide range of reactivities.¹³ In a recent investigation, using this methodology, we have found that glutathione reacts almost exclusively via hydrogen abstraction mechanisms, both with ROS¹⁴ and with carbon radicals produced during guanosine damage by $\bullet\text{OH}$ radicals.¹⁵ In both studies it was found, as expected, that

Received: April 7, 2014

Published: June 2, 2014

the thiol group is responsible for the antioxidant capacity of glutathione. Additionally, it was established that the closest carboxylate, which is absent in most thiols, plays an essential role in the enhancement of this activity when the radical contains a hydrogen atom that is capable of forming an H bond with carboxylate. In this contribution, we intend to use this methodology to explore the antioxidant capacity of LA and DHLA with several radicals in order to determine, at the molecular level, the mechanism of their antioxidant activity.

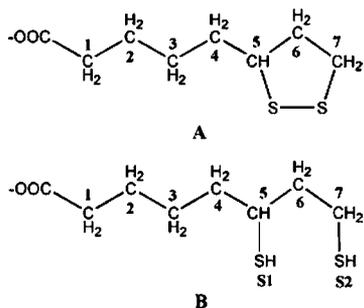
Based on the chemical structures of LA and DHLA, the tested mechanisms are hydrogen transfer (HT), and single electron transfer (SET). Detailed kinetic data are also provided for the first time, and the influence of the environment polarity on the scavenging activity has been assessed.

We have chosen a set of radicals with very different reactivities: the $\cdot\text{OH}$ radical has been included because it is commonly used in experiments and it is the main source of biological damage in living organisms; $\cdot\text{OCH}_3$ is used as an example of an alkoxy radical; $\text{HOO}\cdot$, $\cdot\text{OOCH}_3$, and $\cdot\text{OOCH}_2$ are examples of alkyl peroxy radicals, and $\cdot\text{OOCCH}_3$ is a model for very electronegative peroxy radicals. In this way, we can easily test radicals of very different reactivities, which would be a tremendous task for experimental investigation. In addition, radicals presenting intermediate to low reactivity have been recommended for the studying of the relative scavenging activity of different compounds.^{16,17}

To the best of our knowledge, the in vivo “equilibrium”, as well as the interconversion rates in biological media, has not been quantitatively studied to date. The elucidation of whether LA or DHLA is the most active antioxidant could encourage this kind of work.

The chemical structure, or structures, responsible for the antioxidant capabilities of these compounds, as well as the mechanisms of action and the role of the environment, seem to be important for many researchers in different fields.

The structures of LA and DHLA and the labels used for the studied reaction sites are the following:



COMPUTATIONAL DETAILS

All electronic calculations were performed with the Gaussian 09 package of programs.¹⁸ Geometry optimizations and frequency calculations were carried out using the M06-2X¹⁹ functional and the 6-31++G(d,p) basis set, using an ultrafine grid, in conjunction with the SMD continuum model²⁰ using pentylethanoate and water as solvents to mimic lipid and aqueous environments, respectively. The M05-2X and M06-2X functionals have been recommended and tested for kinetic calculations by their developers.¹⁹ M05-2X has been successfully used by independent authors^{21–26} and M06-2X was developed as an improvement over its predecessor M05-2X. It

is also among the best performing functionals for calculating reaction energies involving free radicals.²⁷ SMD is considered to be a universal solvation model, due to its applicability to any charged or uncharged solute in any solvent or liquid medium for which a few key descriptors are known.²⁰

Unrestricted calculations were used for open shell systems. Local minima and transition states were identified by the number of imaginary frequencies; local minima have only real frequencies, while transition states are identified by the presence of a single imaginary frequency that corresponds to the expected motion along the reaction coordinate. Relative energies are calculated with respect to the sum of the isolated reactants. Thermodynamic corrections at 298.15 K were included in the calculation of relative energies, which correspond to 1 M standard state. In addition, the solvent effects on entropy loss in the liquid phase have been taken into account according to the free volume theory.²⁸

Counterpoise corrections (CP) to the basis set superposition error have not been included, since it has been recently demonstrated that, for a large variety of systems, CP corrected energies systematically differ more from the CBS-extrapolated values than the uncorrected ones. The main reason for such behavior is that the BSSE and the basis set truncation error systematically cancel.^{29,30} Moreover, it has been shown that counterpoise corrections tend to overcorrect the BSSE.³¹

The rate constants (k) were calculated using the conventional transition state theory (TST):^{32–34}

$$k = \sigma \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-(\Delta G^\ddagger)/RT} \quad (1)$$

where k_B and h are respectively the Boltzmann and Planck constants; ΔG^\ddagger is the Gibbs free energy of activation; σ represents the reaction path degeneracy, accounting for the number of equivalent reaction paths; and κ accounts for tunneling corrections. The latter are defined as the Boltzmann average of the ratio of the quantum and the classical probabilities, and they were calculated using the zero curvature tunneling corrections (ZCT).³⁵

For single electron transfer reactions (SET), the barriers were estimated using Marcus theory.^{36,37} It relies on the transition state formalism, defining the SET activation barrier ($\Delta G_{\text{SET}}^\ddagger$) in terms of two thermodynamic parameters, the free energy of reaction (ΔG_{SET}^0) and the nuclear reorganization energy (λ)

$$\Delta G_{\text{SET}}^\ddagger = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G_{\text{SET}}^0}{\lambda} \right)^2 \quad (2)$$

The reorganization energy (λ) has been calculated as

$$\lambda = \Delta E_{\text{SET}} - \Delta G_{\text{SET}}^0 \quad (3)$$

where ΔE_{SET} is the nonadiabatic energy difference between reactants and vertical products. This approach is similar to the one previously used by Nelsen and co-workers³⁸ for a large set of self-exchange reactions.

Some of the calculated rate constant (k) values are close to, or within, the diffusion-limit regime. Accordingly, the apparent rate constant (k_{app}) cannot be directly obtained from TST calculations. In the present work the Collins–Kimball theory³⁹ is used for that purpose:

$$k_{\text{app}} = \frac{k_{\text{D}}k}{k_{\text{D}} + k} \quad (4)$$

where k is the thermal rate constant, obtained from TST calculations, and k_{D} is the steady-state Smoluchowski⁴⁰ rate constant for an irreversible bimolecular diffusion-controlled reaction:

$$k_{\text{D}} = 4\pi R D_{\text{AB}} N_{\text{A}} \quad (5)$$

where R denotes the reaction distance, N_{A} is the Avogadro number, and D_{AB} is the mutual diffusion coefficient of reactants A (free radical) and B (LA or DHLA). D_{AB} has been calculated from D_{A} and D_{B} according to reference 41, and D_{A} and D_{B} have been estimated from the Stokes–Einstein approach:^{42,43}

$$D = \frac{k_{\text{B}}T}{6\pi\eta a} \quad (6)$$

where k_{B} is the Boltzmann constant, T is the temperature, η denotes the viscosity of the solvent (in our case water ($\eta = 8.91 \times 10^{-4}$ Pa s) and pentylethanoate ($\eta = 8.62 \times 10^{-4}$ Pa s)), and a is the radius of the solute.

For the kinetic study we have not included the endergonic reaction paths because, even if they took place at a significant rate, they would be reversible, and therefore, the formed products would not be observed. However, it should be noted that they might still represent significant channels if their products rapidly react further. This would be particularly important if these further stages were sufficiently exergonic to provide a driving force and if their barriers of reactions were low. This could be the case for the SET reactions in aqueous solution since they yield reactive species and take place at relatively large reaction distances. In addition, slightly endergonic processes can be important when there are no exergonic competing paths, but this was not the case in the present study.

RESULTS AND DISCUSSION

Multireference Diagnostics. Before starting the study of the system of interest with M06-2X, which is based on a single-determinant reference state, it is important to assess whether such a formalism is suitable. In recent publications, Tishchenko et al.^{44,45} proposed that the transition states corresponding to H abstraction from the hydroxyl group in phenol by $\bullet\text{OOCH}_3$,⁴⁴ and from the hydroxyl group in vinyl alcohol by $\bullet\text{OH}$,⁴⁵ are affected by multireference effects. These findings may lead to the conclusion that transition states of hydrogen atom transfers, from OH groups that are linked to π electron systems, to oxygenated radicals suffer from multireference character. In a more recent publication by the same group,⁴⁶ it was found that the transition state of the $\text{HOO}\bullet$ hydrogen abstraction from the hydroxyl group in methanol also presents significant multireference character, according to the T1 diagnostic. This suggests that multireference issues may also affect saturated systems. It has been established that a T1 value of 0.02 or greater indicates a significant multireference character for closed-shell systems. On the other hand, for open shell systems such as the ones in the present study, the benchmark value accepted so far is considerably larger and equal to 0.045. Moreover, since it has been shown that density functionals with a high fraction of Hartree–Fock (HF) exchange are often inaccurate for multireference systems,^{47–49} such systems would not be properly described using the M06-2X functional. Because of structural similarities with alcohols,

thiols could also be affected. However, it should be mentioned that canolol⁵⁰ and esculetin,⁵¹ which are phenolic antioxidants were tested, and they certainly do not present significant multireference character.

Consequently in the present work the reliability of this functional has been tested. We have performed the T1 test for the main HT transition states in the DHLA + $\text{HOO}\bullet$ reaction and compared the results with those for the previously described systems at CCSD(T)/6-311+G(d)//M05-2X/6-311+G(d,p) level of theory for the transition states corresponding to H abstractions, when the abstraction takes place from the SH moiety. The values obtained from the T1 diagnostic are presented in Table 1. The value for the methanol

Table 1. Values of T1 Diagnostic for Transition States Involved in H Abstractions by Oxygenated Radicals, for the O–H or S–H Moiety in Different Systems

system	T1 diagnostic
ethanol + $\bullet\text{OH}$	0.044 ^a
phenol + $\bullet\text{OOCH}_3$	0.044 ^a
phenol + $\bullet\text{OH}$	0.041 ^a
methanol + $\text{HOO}\bullet$	0.048 ^b
canolol + $\text{HOO}\bullet$	0.023 ^b
esculetin + $\text{HOO}\bullet$	0.030 ^c
DHLA S1 + $\text{HOO}\bullet$	0.019
DHLA S2 + $\text{HOO}\bullet$	0.021

^aFrom ref 50. ^bFrom ref 46. ^cFrom ref 51.

+ $\text{HOO}\bullet$ system was taken from ref 46 and was obtained at the CCSD(T)/aug-cc-pVDZ//M06-2X/MG3S level of theory. According to values in Table 1, we can safely conclude that, based on the T1 diagnostic, the thiols + peroxy radical systems have no important multireference character; moreover, the T1 values are the lowest among the studied systems.

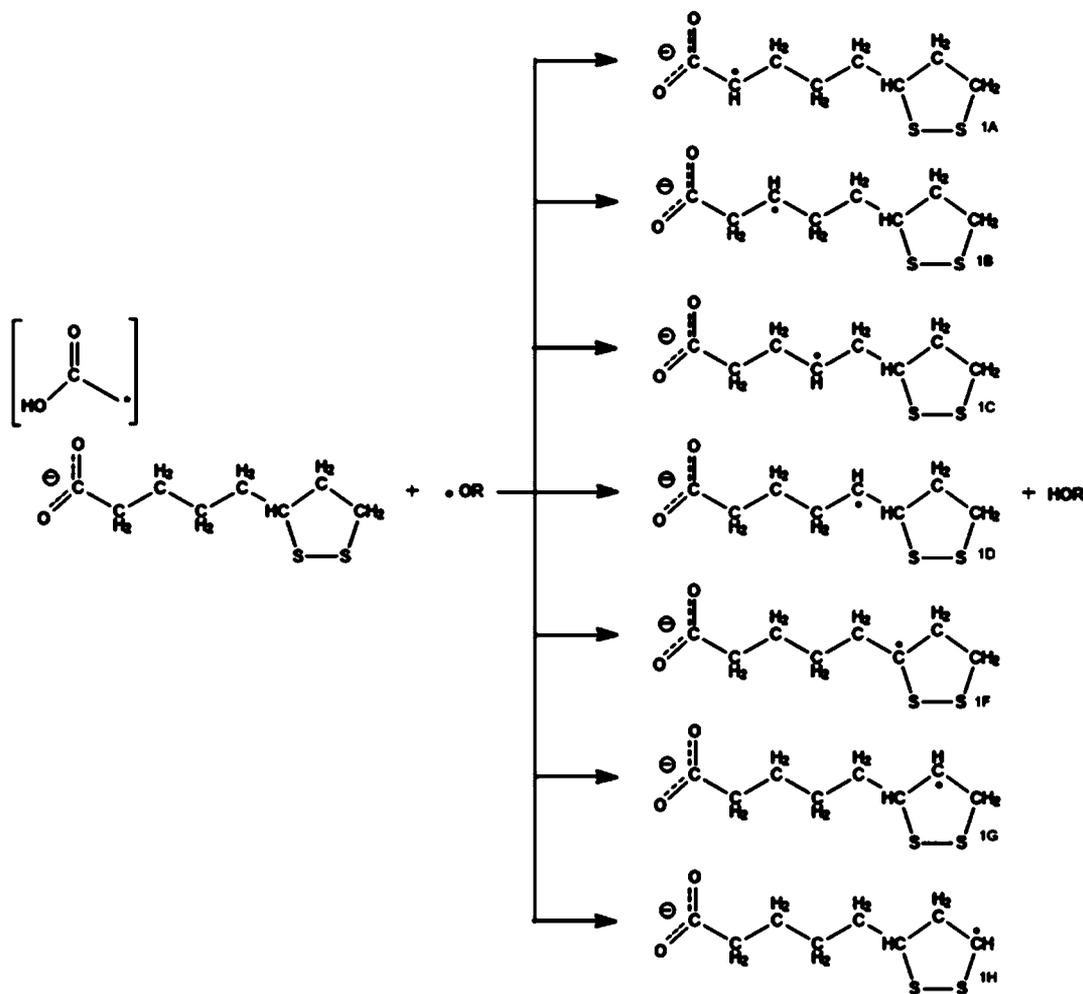
Antioxidant Activity. As is the case for many scavengers,^{52–56} the free radical scavenging activity of LA and DHLA can take place through a variety of mechanisms. The ones considered in this work are shown in the following schemes: Scheme 1 for hydrogen transfer (HT) from LA; Scheme 2 for HT from DHLA; and Scheme 3 for single electron transfer (SET) mechanisms for both LA and DHLA. Since in water both acids are deprotonated, the carboxylate form was modeled. In nonpolar media we used protonated forms.

The SET mechanism need not be included in nonpolar environments since the latter do not promote the necessary solvation of the intermediate ionic species yielded by this mechanism. However, just to prove this point, the reaction energies for the SET process were calculated and found to be larger than 73 kcal/mol in all cases.

To obtain an initial screening of the reactivity and thermodynamic viability of the studied reactions we have calculated the Gibbs free energies of all possible reaction channels. They are shown in Tables 2–5 for LA and DHLA, and for both media (lipid or aqueous).

The first conclusion that can be drawn from thermodynamic data is that, as expected, hydrogen abstraction reactions by $\bullet\text{OH}$, for both acids (LA and DHLA) and for almost all positions, are very exergonic. The $\bullet\text{OH}$ radical is very reactive, because the O–H bond in the water molecule is very strong; therefore, we expect, as usual, a low selectivity for $\bullet\text{OH}$ reactions with LA and DHLA. Thus, we anticipate almost

Scheme 1. Studied Reaction Channels for the HT Mechanism from LA



diffusion controlled reactions of $\bullet\text{OH}$ with many of the H atoms of the studied molecules, as previously found in the study of the reactions of glutathione with the $\bullet\text{OH}$ radical.¹⁴ For this reason we will not include hydrogen transfer reactions with $\bullet\text{OH}$ radical in the kinetics section, and assume that they will proceed at diffusion-limited rates. Such reactivity of OH has created a misconception about inevitability of oxidative stress because antioxidants cannot react faster than OH. However, it is important to note that OH is not the enemy to fight; other reactive species, including its precursors, are the actual targets of antioxidants.⁵⁷ Qualitatively, the same situation can be observed for the $\bullet\text{OCH}_3$ radical; however, these reactions are much less exergonic; therefore, they are probably not as fast as the reactions with $\bullet\text{OH}$. To which extent? This question can be answered only via kinetic calculations.

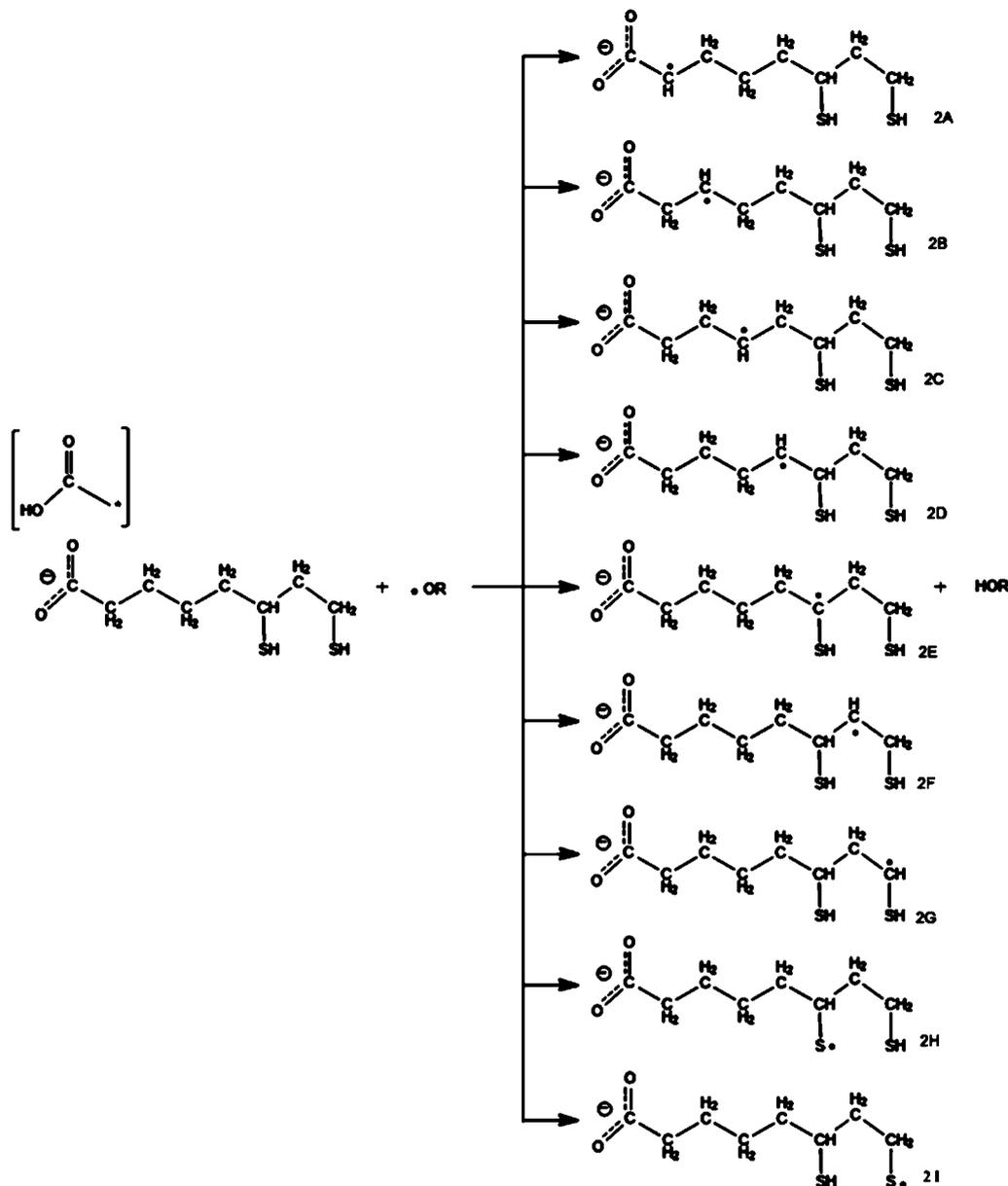
Regarding H abstraction reaction with the much less reactive alkylperoxyl radicals, the situation changes dramatically. The only bonds that are weak enough to be exergonically broken by these radicals are the S–H ones. The H–OO bond in HOOH is much weaker than the H–O bond in the H₂O molecule, and therefore it is not strong enough to favor the breaking even of a tertiary C–H bond. It is noticeable that there are no exergonic reaction channels for H abstraction from LA by either HOO• or $\bullet\text{OOCH}_3$. Accordingly it is not expected that LA can successfully scavenge hydroperoxyl or alkylperoxyl radicals via hydrogen transfer. This great difference between the LA and

DHLA reactivities is the first exciting result from this work. LA, contrary to what is commonly assumed, cannot be considered as an antioxidant because, even if it deperatures OH and alkoxy radicals, it reacts with them with rate constants that are similar to the ones for reaction with biological targets.

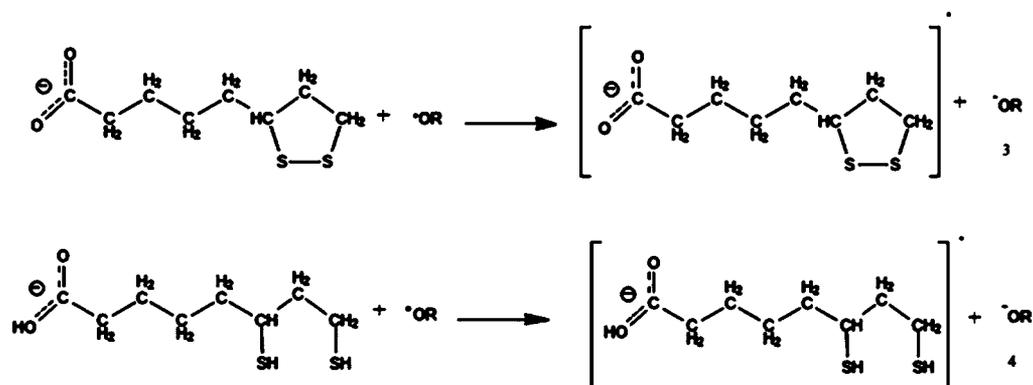
No large differences are observed between results in aqueous and lipid media. However, the reactions in water are systematically more exergonic, by 1–6 kcal/mol, than in lipid media. These differences are larger for the $\bullet\text{OOCCH}_3$ reactions.

As expected, in lipid media the SET reactions are largely endergonic for both antioxidants, since the anionic products are not stabilized in a nonpolar solvent. The thermochemistry of the single electron transfer (SET) reaction mechanism in aqueous medium is different than HT. For the reaction of $\bullet\text{OH}$ radical with LA the electron loss is exergonic by approximately 6 kcal/mol, whereas the corresponding DHLA reaction is endergonic by 19 kcal/mol. Therefore, it can be concluded that LA is capable of reacting via SET with very electrophilic radicals, whereas DHLA is not reactive via this mechanism. The deprotonated S–H form of DHLA could, in principle, react via SET. However, it is not significantly deprotonated at physiological pH, since the S–H $\text{p}K_a$ ⁵⁸ is close to 10.7. As we will show later, its neutral form is very reactive via HT. Thus, the deprotonated form is not expected to play any role in the antioxidant activity of DHLA as was demonstrated recently for glutathione.¹⁴

Scheme 2. Studied Reaction Channels for the HT Mechanism from DHLA



Scheme 3. Studied SET Reactions for Both LA and DHLA in Water



From thermodynamic data and comparisons with previous results we can conclude that LA reacts only with very reactive radicals, and that the reaction is diffusion controlled and

nonselective. As a consequence, the in vivo antioxidant activity of LA–DHLA can only be attributed to DHLA. In a second stage of this work we will model the kinetics of the exergonic

Table 2. Reaction-Free Energy, ΔG^0 , for Electron Transfer (SET) and Hydrogen Transfer (HT) for LA for Different Radicals (solvent water)

	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OCH}_3$	$\text{HOO}\bullet$	$\bullet\text{OOCH}_3$	$\bullet\text{OOCHCH}_2$	$\bullet\text{OOCCL}_3$
SET	-6.1	5.0	17.9	26.0	20.0	3.5
HT-1	-28.1	-12.8	4.1	5.8	4.5	-3.6
HT-2	-23.9	-8.7	8.2	9.9	8.6	0.5
HT-3	-23.6	-8.4	8.5	10.2	8.9	0.8
HT-4	-24.3	-9.0	7.8	9.5	8.2	0.1
HT-5	-29.0	-13.7	3.1	4.9	3.6	-4.6
HT-6	-24.8	-9.6	7.3	9.0	7.7	-0.4
HT-7	-27.4	-12.1	4.8	6.5	5.1	-3.0

Table 3. Reaction Free Energy, ΔG^0 , for Electron Transfer (SET) and Hydrogen Transfer (HT) for DHLA for Different Radicals (solvent water)

	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OCH}_3$	$\text{HOO}\bullet$	$\bullet\text{OOCH}_3$	$\bullet\text{OOCHCH}_2$	$\bullet\text{OOCCL}_3$
SET	19.1	30.0	43.0	51.2	45.2	28.7
HT-1	-27.9	-12.6	4.3	6.0	4.7	-3.4
HT-2	-24.3	-9.0	7.8	9.5	8.2	0.1
HT-3	-25.4	-10.2	6.7	8.4	7.1	-1.0
HT-4	-23.3	-8.0	8.9	10.6	9.3	1.1
HT-5	-29.1	-13.8	3.1	4.8	3.5	-4.7
HT-6	-26.3	-11.0	5.9	7.6	6.3	-1.8
HT-7	-26.8	-11.5	5.4	7.1	5.8	-2.3
HT-S1	-37.8	-22.6	-5.7	-4.0	-5.3	-13.4
HT-S2	-37.2	-21.9	-5.1	-3.4	-4.7	-12.8

Table 4. Reaction Free Energy, ΔG^0 , for Electron Transfer (SET) and Hydrogen Transfer (HT) for LA for Different Radicals (solvent pentylethanoate)

ΔG^0	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OCH}_3$	$\text{HOO}\bullet$	$\bullet\text{OOCH}_3$	$\bullet\text{OOCHCH}_2$	$\bullet\text{OOCCL}_3$
SET	49.4	59.8	69.5	70.1	58.7	37.0
HT-1	-24.3	-9.1	8.1	10.2	9.0	1.6
HT-2	-19.9	-4.6	12.6	14.7	13.5	6.0
HT-3	-20.4	-5.1	12.0	14.1	13.0	5.5
HT-4	-22.1	-6.8	10.3	12.4	11.3	3.8
HT-5	-25.6	-10.4	6.8	8.9	7.7	0.3
HT-6	-21.2	-5.9	11.2	13.3	12.2	4.7
HT-7	-24.3	-9.0	8.2	10.3	9.1	1.6
HT-O	6.4	21.7	38.8	40.9	39.7	32.3

Table 5. Reaction Free Energy, ΔG^0 , for Electron Transfer (SET) and Hydrogen Transfer (HT) for DHLA for Different Radicals (solvent pentylethanoate)

ΔG^0	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OCH}_3$	$\text{HOO}\bullet$	$\bullet\text{OOCH}_3$	$\bullet\text{OOCHCH}_2$	$\bullet\text{OOCCL}_3$
SET	73.5	83.9	93.6	94.2	82.8	61.1
HT-1	-25.4	-10.1	7.0	9.2	8.0	0.5
HT-2	-19.6	-4.3	12.9	15.0	13.8	6.3
HT-3	-21.7	-6.4	10.7	12.8	11.7	4.2
HT-4	-21.8	-6.5	10.6	12.7	11.6	4.1
HT-5	-25.1	-9.9	7.3	9.4	8.2	0.8
HT-6	-21.7	-6.4	10.8	12.9	11.7	4.2
HT-7	-23.4	-8.1	9.0	11.1	10.0	2.5
HT-S1	-35.3	-20.0	-2.8	-0.7	-1.9	-9.4
HT-S2	-33.7	-18.4	-1.3	0.8	-0.4	-7.8
HT-O	-5.9	9.4	26.5	28.6	27.5	20.0

reaction channels with all radicals, except for the most reactive $\bullet\text{OH}$ radical, whose reactivity is so large that it abstracts almost

any H atom. In this way we shall be able to evaluate the Gibbs free energy barriers and rate constants, and therefore quantitatively assess the primary antioxidant activity.

Kinetic Study. We have performed the kinetic study of all exergonic reaction channels obtained in the thermodynamic study. These reaction channels are the only candidates expected to have large enough rate constants. In the particular case of the $\bullet\text{OH}$ radical reactions, their kinetics were excluded because the reactions are expected to be diffusion controlled. The Gibbs free energy of activation (ΔG^\ddagger) for the different reaction channels involving LA and DHLA in water, are reported in Table 6 and 8, while those in pentylethanoate are given in Tables 7 and 9.

Table 6. Rate Constants (k) and Gibbs Free Energy of Activation (ΔG^\ddagger) for Reactions for Lipoate, in Water

	$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOCCL}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	$k(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	$k(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
SET	—	5.4×10^6	—	2.2×10^8
HT-1	9.2	8.2×10^6	12.6	4.6×10^4
HT-2	8.3	2.6×10^7	11.1	2.0×10^5
HT-3	10.6	7.4×10^5	14.9	5.7×10^2
HT-4	11.9	1.2×10^5	12.7	2.4×10^4
HT-5	7.9	1.1×10^7	9.1	2.9×10^6
HT-6	12.0	1.2×10^5	13.2	1.7×10^4
HT-7	8.5	6.9×10^6	8.8	4.6×10^6
total	—	5.86×10^7	—	2.26×10^8
total (exp) ¹²	—	—	—	1.8×10^8

Table 7. Rate Constants (k) and Gibbs Free Energy of Activation (ΔG^\ddagger) for Hydrogen Abstraction from LA, in Pentylethanoate

	$\bullet\text{OCH}_3$		$\bullet\text{OOCCL}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	$k(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	$k(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
HT-1	13.7	1.3×10^4	20.3	8.8×10^{-1}
HT-2	13.0	2.4×10^4	—	—
HT-3	13.9	5.4×10^3	—	—
HT-4	14.1	4.8×10^3	—	—
HT-5	10.1	4.8×10^5	11.7	2.9×10^4
HT-6	14.6	3.6×10^3	—	—
HT-7	9.7	1.1×10^6	13.3	2.7×10^3
total	—	1.6×10^6	—	3.2×10^4

The comparison between DHLA and LA again shows that the first is much more reactive than the latter. The trend observed in the Gibbs energy barriers shows that the SH groups are responsible for most of the antioxidant activity, these barriers being the lowest in all cases. The comparison of the LA and DHLA Gibbs free energies of activation shows that, even for the less selective $\bullet\text{OCH}_3$ radical, the barrier for the SH site in DHLA is approximately 1.5 kcal/mol lower than the lowest ΔG^\ddagger for LA. For less reactive radicals the reaction is thermodynamically disfavored for LA. From all the studied channels shown in Schemes 1–3 only reaction channels 2H and 2I, see Scheme 2, are responsible for the antioxidant activity of LA–DHLA pair.

It is important to call attention to the exceptionally small ΔG^\ddagger of activation for the reaction of $\text{HOO}\bullet$ with DHLA in aqueous solution, which is even lower than the corresponding barrier in the $\bullet\text{OCH}_3$ reaction. This situation is not observed in

Table 8. Rate Constants (k) and Gibbs Free Energy of Activation (ΔG^\ddagger) for Hydrogen Abstraction in DHLA, in Water

	$\bullet\text{OCH}_3$		$\text{HOO}\bullet$		$\bullet\text{OOCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
HT-1	9.5	5.6×10^6	—	—	—	—
HT-2	10.4	8.8×10^5	—	—	—	—
HT-3	11.0	3.9×10^5	—	—	—	—
HT-4	11.7	1.7×10^5	—	—	—	—
HT-5	8.6	5.4×10^6	—	—	—	—
HT-6	10.6	1.2×10^6	—	—	—	—
HT-7	9.4	2.0×10^6	—	—	—	—
HT-S1	7.3	6.1×10^7	16.2	9.0×10^2	15.7	2.0×10^3
HT-S2	6.9	5.1×10^7	6.4	1.3×10^8	13.4	4.0×10^4
total	—	1.3×10^8	—	1.3×10^8	—	4.2×10^4
total (exp) ^a		1.32×10^8				
		2.92×10^8				

	$\bullet\text{OOCHCH}_2$		$\bullet\text{OOCCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
HT-1	—	—	13.0	2.3×10^4
HT-2	—	—	10.6	6.2×10^5
HT-3	—	—	12.2	4.7×10^4
HT-4	—	—	12.5	3.9×10^4
HT-5	—	—	10.0	8.9×10^5
HT-6	—	—	12.7	3.4×10^4
HT-7	—	—	10.8	2.0×10^5
HT-S1	13.2	6.1×10^4	12.4	2.1×10^5
HT-S2	13.0	3.6×10^4	11.8	2.6×10^5
total	—	9.7×10^4	—	2.3×10^6
total (exp)				2.7×10^7

^aAssuming that the rate constant of $\text{O}_2^{\bullet-}$ is because of its conjugated acid $\text{HOO}\bullet$ with 0.0025 molar fraction at pH 7.4.¹²

Table 9. Rate Constants (k) and Gibbs Free Energy of Activation (ΔG^\ddagger) for Hydrogen Abstraction from DHLA, in Pentylethanoate

	$\bullet\text{OCH}_3$		$\text{HOO}\bullet$		$\bullet\text{OOCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
HT-1	13.6	1.9×10^4	—	—	—	—
HT-2	14.4	3.1×10^3	—	—	—	—
HT-3	13.6	6.6×10^3	—	—	—	—
HT-4	14.6	3.1×10^3	—	—	—	—
HT-5	8.9	4.9×10^6	—	—	—	—
HT-6	13.8	9.4×10^3	—	—	—	—
HT-7	11.8	5.6×10^4	—	—	—	—
HT-S1	7.1	7.0×10^7	15.19	2.1×10^3	16.2	4.1×10^2
HT-S2	8.7	3.3×10^6	15.46	9.0×10^2	16.6	1.2×10^2
total	—	7.83×10^7	—	2.96×10^3	—	5.3×10^2

	$\bullet\text{OOCHCH}_2$		$\bullet\text{OOCCH}_3$	
	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)	k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
HT-1	—	—	20.1	1.11
HT-5	—	—	13.6	2.2×10^3
HT-7	—	—	14.2	8.7×10^2
HT-S1	15.2	1.5×10^3	13.5	2.2×10^4
HT-S2	16.7	1.1×10^2	13.6	9.3×10^3
total	—	1.6×10^3	—	3.41×10^4

a simulated lipid environment, and the explanation can be found in the structure of the transition state shown in Figure 1. As can be seen in Figure 1a, in the transition state of $\text{HOO}\bullet$ in water, the deprotonated carboxyl group and the electron-deficient $\text{HOO}\bullet$ hydrogen atom form a very strong H bond between the two moieties. This results in a free energy of activation which is much lower than what would be expected

from the bond dissociation energies (BDE) of the breaking S–H bond and the forming H–OOH bond. Although DHLA has two SH groups, only one of them is in a conformation that is appropriate for the formation of this type of hydrogen bonding. The other one can be used to assess the magnitude of the effect; as can be seen from Table 8, the S2 transition state is approximately 10 kcal/mol more stable than for S1. The effect

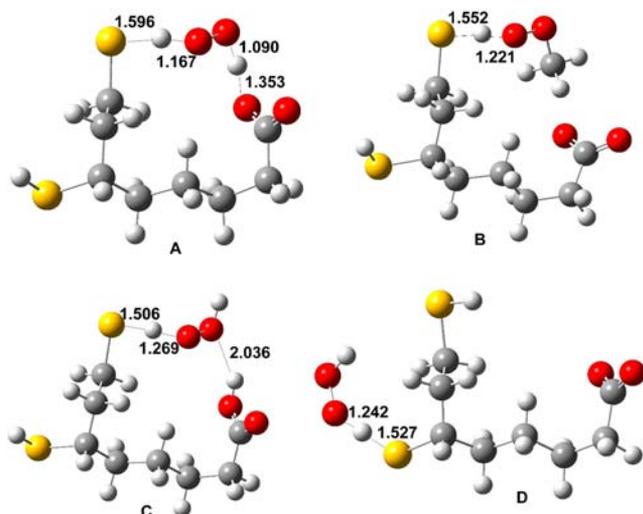


Figure 1. Molecular graphics and main geometrical parameters of selected transition states (A) TS-HT-S2 with OOH in water, (B) TS-HT-S2 with OOOCH₃ in water, (C) TS-HT-S2 with OOH in pentylethanoate, (D) TS-HT-S1 with OOH in water.

of the carboxylate moiety is so important that, even for the transition state of the rest of the radicals that cannot form a hydrogen bond (all except HOO[•]), the S2 transition state is less energetic than S1, even though the latter is bonded to a tertiary carbon atom while the first is bonded to a secondary carbon atom.

In simulated lipid media the carboxyl group is protonated, and therefore, the H bond is much weaker (Figure 1B) and has no effect on the free energies of activation. Consequently, the S1 position has a slightly lower free energy of activation because S1 is bonded to a tertiary carbon atom. The transition state with [•]OCH₃ (Figure 1-C) has no possibility of forming an especially stable transition state and the situation in both media is similar to the one for HOO[•] in a lipid medium.

The order of overall reactivities for radicals involved in H abstraction in water is HOO[•] ≈ [•]OCH₃ > [•]OOCHCH₂ > [•]OOCH₃, whereas in lipid medium it is [•]OCH₃ > [•]OOCHCH₂ > [•]OOCH₃ > HOO[•]; i.e. the hydrogen bond in the transition state between H–OO and carboxylate inverts the order of reactivities, transforming the less reactive radical HOO[•] into one of the most reactive. Taking into account the importance of the O₂^{•−} + H⁺ ⇌ HOO[•] equilibrium in biological systems, and the great importance of the superoxide radical, this situation could be of great relevance in understanding the role of SH groups close to a carboxylate moiety in living systems.

The Gibbs free energy of activation is an excellent criterion to evaluate the rate of radical scavenging reactions. Moreover, since the units are kcal/mol, they are easily assimilated for those readers that are accustomed to making comparisons using energy units. However, there is an important factor that is missed in classical Gibbs free energies of activation, i.e. the tunneling corrections, which for this kind of reaction have been reported to play an important role.^{59–61} Additionally, it is more common to make comparisons in terms of rate constants. For these reasons we have calculated the rate constants for each reaction channel using conventional transition state theory and ZCT tunneling corrections. We are assuming that the variational effects are not important in this case, because in the very few previous studies for HT reactions involving antioxidants it was found to be unimportant.^{59,61}

The calculated rate constants are reported in Tables 6 and 7, for the reactions of LA with the most reactive radical, [•]OCH₃, in water and pentylethanoate. In water we have also included the [•]OOCCl₃ radical. Its rate constants are large for almost all positions, independently of the nature of the site, in agreement with the low selectivity of this very reactive radical. It is important to mention that [•]OOCCl₃ and [•]OCH₃ radicals would react with similar rates with structurally equivalent biological molecules. It is well-known that, in order to be considered a good antioxidant, a compound should react faster than the biological targets. This is definitively not the case of LA with most of the studied free radicals. It should be noticed that we have not tabulated the rate constants of [•]OOCCl₃ with LA in lipid media, the reason being that the corresponding reactions are endergonic. In this case, even if the reactions were fast, as expected, the reverse reactions would be even faster because of the low equilibrium constant.

The calculated rate constants for H abstraction from DHLA, in both water and pentylethanoate, are reported in Tables 8 and 9, respectively. The first conclusion is that the reactions are much faster in water than in pentylethanoate. In the case of the very reactive alkoxyl radical the ratio *k*_{water}/*k*_{pentylethanoate} is about 2, while for the less reactive OOOCH₃ the ratio is approximately 78. It is significant that the ratio for OOH radical is more than 4 orders higher ($4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), with an overall rate constant, in water, of $1.28 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, i.e. the reaction is almost diffusion controlled. This rate constant positions DHLA among the best OOH scavengers in water, which is the most important medium for biological systems. It is important to notice that this exceptional reactivity is due not only to the presence of the S–H moiety but also to the strong H bond that is formed with COO[−] in the transition state. This situation occurs also in the case of glutathione; however, in the present case the lowering in the energy barrier is even more important, probably because the relative positions of SH and COO[−] are optimal.

This is one of the most important findings of this contribution. Usually the reactivity of certain positions in a molecule can be evaluated via the stability of the formed products, in agreement with Bell–Evans–Polanyi principle. In the present case, however, a large deviation from this principle occurs because the reaction of [•]OCH₃ at the S2 position is approximately 15 kcal/mol more exothermic than the corresponding reaction with an OOH radical; while the rate constants are very similar, i.e., even though both S–H positions have similar bond dissociation energies (BDE), their reactivities are very different. In the present case the carboxylate anion acts as an intramolecular catalyst in a manner that is similar to the one used by enzymes. The only way to observe such a dynamic interaction is by modeling the transition states, as we have done in this article.

If the rate constant with HOO[•] radicals in lipid media is used as a comparison criterion, DHLA and 34-DHBA are predicted to react almost as fast as Trolox ($3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶² which is frequently used as an antioxidant reference. Compared to other antioxidants, the peroxy radical scavenging activity of this compound was found to be lower than those of carotenes ($\sim 10^5\text{--}10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{63,64} dopamine ($8.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁵ canolol ($6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁰ and hydroxytyrosol ($6.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);⁶⁶ sesamol ($3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁷ and sinapinic acid ($1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁶⁸ It is similar to those of protocatechuic acid (5.1×10^3),⁶⁹ capsaicin (6.5×10^3),⁷⁰ and α -mangostin ($7.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);⁷¹ and higher than those of tyrosol ($7.1 \times$

$10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁶ melatonin ($3.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁷² and caffeine ($3.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁵⁶

In aqueous solution the overall rate constants of the reactions of DHLA with ROO^\bullet are much higher than in nonpolar media. This is mainly caused by the influence of the carboxylate group. Therefore, it can be stated that the anionic forms are much better peroxy, and particularly HOO^\bullet , scavengers than the neutral species. In such a media, DHLA is predicted to react with HOO^\bullet 1.4×10^3 times faster than Trolox ($8.96 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁶² Compared to other antioxidants, DHLA is predicted to have peroxy radical scavenging activity much higher than those of melatonin ($2.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷² caffeine ($3.3 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁶ allicin ($7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷³ thioacrolein ($2.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷³ and dopamine ($2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$);⁶⁵ and even higher than excellent antioxidants such as canolol ($2.50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁵⁰ α -mangostin ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷¹ protocatechuic acid ($1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁹ 2-propenesulfenic acid ($2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁷³ glutathione ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),¹⁴ sesamol ($2.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),⁶⁷ and resveratrol (5.62×10^7).⁷⁴ Only piceatannol ($1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁷⁴ has a larger rate constant. Therefore, it can be stated that in aqueous solution, at physiological pH, DHLA is among the best peroxy radical scavengers identified so far.

In order to analyze the relative importance of the different mechanisms and reaction paths on the overall HOO^\bullet scavenging activity of the studied DHLA, the branching ratios have been estimated (Tables S1 and S2, Supporting Information [SI]), according to

$$\Gamma_i^{\text{PE}} = \frac{k_i}{k_{\text{tot}}} \times 100 \quad (7)$$

$$\Gamma_i^{\text{W,pH=7.4}} = \frac{k_i}{k_{\text{overall}}^{\text{W,pH=7.4}}} \times 100 \quad (8)$$

where i represents each particular path

As was pointed out before, the S–H moieties are responsible for the antioxidant activity, and the S–H group located close to the carboxylate group in water solution is responsible for the unexpected scavenging activity in this environment.

In conclusion we can say that, according to our calculated rate constants, in aqueous media DHLA is an excellent antioxidant that, if present in appropriate concentrations, will prevent oxidative damage because it reacts much faster than any biological target with the studied radicals. The latter have been chosen to represent a wide range of reactivities. Particularly, for OOH radicals, the rate constants are so fast that it would prevent oxidative damage even at low concentrations.

It is important to mention that, since the antioxidant action of thiols is due to the homolysis of an S–H bond, in principle the polarity of the solvent would not be expected to have a large influence. However, since a polar solvent increases the acidity of the carboxyl group, thus enabling the formation of carboxylate that in turn can catalyze the reaction, the antioxidant capacity of DHLA increases dramatically in water.

Comparison of the Calculated Rate Constants with Experimental Values. The methodology used in this work has been previously tested against experimentally measured rate constants, and the maximum deviation found between theoretical and experimental rate constants values is a factor of 2, which is about the same as the deviation between any two experimental values.¹³ However, as with any modeling, when possible it needs to be tested against experimental data.

Only a few experimental rate constants have been reported for the systems studied in this work. However, these few values allow us to prove again, for these particular systems, that our methodology is correct. We have shown that LA is not a good antioxidant because it reacts only with very reactive radicals such as $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OCH}_3$, and $\bullet\text{OOCCL}_3$. This seems to be in contradiction with the fact that the experimental rate constants for the $\bullet\text{OH}$ reactions are larger with LA than with DHLA. Our calculations show that, because LA is capable of reacting via SET with very electrophilic radicals, even if it does not react at all with peroxide radicals it reacts faster than DHLA with $\bullet\text{OOCCL}_3$. Our calculated rate constant for LA + $\bullet\text{OOCCL}_3$ ($2.26 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is in excellent agreement with the experimental value ($1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹² This value is larger than the one for DHLA + $\bullet\text{OOCCL}_3$. In this case the agreement with experiment is not as excellent but is still quite good.

According to Packer et al.⁷ LA scavenges neither methylperoxy radicals nor superoxide radical anions. In this work we arrive exactly at the same conclusions.

Packer et al.⁷ also found that the situation is quite different for DHLA. Although it is slightly less reactive with very reactive radicals, it is capable of reacting very fast with HOO^\bullet , and therefore scavenges via acid/base equilibrium its conjugated base, the $\text{O}_2^{\bullet-}$ radical. It can also scavenge practically any radical, including alkyl peroxide radicals. Our results are in excellent agreement with this qualitative experimental evidence. Regarding the scarce quantitative data available, our calculated rate constant for $\text{HOO}^\bullet / (\text{O}_2^{\bullet-})$ $1.28 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ is in perfect agreement with one of the experimental rate constants $1.32 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹²

CONCLUSIONS

Lipoic acid itself is not a good primary antioxidant because it does not deplete the less reactive, long-lived, radicals that are of huge importance for oxidative stress. On the other hand almost any molecule in a living organism can react with OH radicals at almost diffusion-controlled rates.

Dihydrolipoic acid is an excellent antioxidant capable of scavenging almost any oxygen-centered radical as well as others with similar reactivity.

While lipoic acid is a mild electron donor that is capable of reacting with very electrophilic radicals, DHLA is an excellent donor of H atoms that reacts essentially via a hydrogen transfer mechanism.

Even though it is important to know which one of LA and DHLA is the one acting as antioxidant within living organisms, it should be recalled that they are in equilibrium via biochemical reactions in vivo. The results of this work illustrate the need for studying in detail the interconverting rate of one into another in order to find out which one is favored in the equilibrium. This of course should be done in vivo. Only if DHLA concentrations are important and the interconversion is fast, it would be relatively unimportant which form is consumed.

Dihydrolipoic acid is one of the few antioxidants that is capable of reacting with HOO^\bullet radicals at rates of the order of $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and it is the only one, to our knowledge, that can react as fast via a hydrogen transfer mechanism. This is related to the unique structure of DHLA that places the –SH and –COO[–] moieties at an ideal distance to “trap” the HOO^\bullet radical and transfer an H atom to it, which is exactly the same way the active sites of enzymes work, i.e. the catalyst is near the reactive site in a perfect place.

The methodology used in this study, has proven once again its validity for the study of any kind of reaction rates of ROS with antioxidants, and therefore for antioxidant activity. It seems to be an excellent complement to experimental studies.

These conclusions are in perfect agreement with the few experimental data available, within the expected accuracy of experimental results and theoretical calculations.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

Calculated branching ratios, details of SET mechanism results, tunneling corrections, Cartesian coordinates of main transition states (those shown in Figure 1), and reactants. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: jjidaboy@unam.mx

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We 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 Project SEP-CONACyT 167430. R. C.-A. acknowledges the economic support of CONACyT.

■ REFERENCES

- (1) Raddatz, G.; Bisswanger, H. Receptor site and stereospecificity of dihydrolipoamide dehydrogenase for R- and S-lipoamide: a molecular modeling study. *J. Biotechnol.* **1997**, *58*, 89–100.
- (2) Fujiwara, K.; Okamura-Ikeda, K.; Motokawa, Y. Lipoylation of Acyltransferase Components of α -Ketoacid Dehydrogenase Complexes. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12932–12936.
- (3) Akiba, S.; Matsugo, S.; Packer, L.; Konishi, T. Assay of Protein-Bound Lipoic Acid in Tissues by a New Enzymatic Method. *Anal. Biochem.* **1998**, *258*, 299–304.
- (4) Wollin, S. D.; Jones, P. J. α -Lipoic Acid and Cardiovascular Disease. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3327–3330.
- (5) Biewenga, G. Ph.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* **1997**, *29*, 315–331.
- (6) Packer, L.; Suzuki, Y. J. Vitamin E and alpha-lipoate: Role in antioxidant recycling and activation of the NF- κ B transcription factor. *Mol. Aspects Med.* **1993**, *14*, 229–239.
- (7) Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *19*, 227–250.
- (8) Packer, L.; Roy, S.; Sen, C. K. Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 79–101.
- (9) Packer, L. α -Lipoic acid: A metabolic antioxidant which regulates NF- κ B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab. Rev.* **1998**, *30*, 245–275.
- (10) Zhao, F.; Liu, Z. Q. Comparison of antioxidant effectiveness of lipoic acid and dihydrolipoic acid. *J. Biochem Mol. Toxicol.* **2011**, *25*, 216–223.
- (11) Buxton, G. B.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (\bullet OH/ \bullet O $^-$) in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513–886.
- (12) Suzuki, Y. J.; Tsuchiya, M.; Packer, L. Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radical Res. Commun.* **1991**, *15*, 255–263.

- (13) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. A computational methodology for accurate predictions of rate constants in solution: Application to the assessment of primary antioxidant activity. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 2430–2445.

- (14) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Adv.* **2011**, *1*, 1763–1771.

- (15) Alvarez-Idaboy, J. R.; Galano, A. On the chemical repair of DNA radicals by glutathione: Hydrogen vs electron transfer. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 9316–9325.

- (16) Rose, R. C.; Bode, A. M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1135–1142.

- (17) Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 1–16.

- (18) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Revision B.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

- (19) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, non-covalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.

- (20) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. 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. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.

- (21) Velez, E.; Quijano, J.; Notario, R.; Pabón, E.; Murillo, J.; Leal, J.; Zapata, E.; Alarcón, G. A computational study of stereospecificity in the thermal elimination reaction of menthyl benzoate in the gas phase. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 971–977.

- (22) Perez-Gonzalez, A.; Galano, A. OH radical scavenging activity of edaravone: Mechanism and kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1306–1314.

- (23) Black, G.; Simmie, J. M. Barrier heights for H-atom abstraction by HO $_2$ from *n*-butanol: A simple yet exacting test for model chemistries? *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1236–1248.

- (24) Furuncuoglu, T.; Ugur, I.; Degirmenci, I.; Aviyente, V. Role of chain transfer agents in free radical polymerization kinetics. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1823–1835.

- (25) Gao, T.; Andino, J. M.; Alvarez-Idaboy, J. R. Computational and experimental study of the interactions between ionic liquids and volatile organic compounds. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9830–9838.

- (26) Iuga, C.; Sainz-Díaz, C. I.; Vivier-Bunge, A. On the OH initiated oxidation of C2–C5 aliphatic aldehydes in the presence of mineral aerosols. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2010**, *74*, 3587–3597.

- (27) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. How well can new-generation density functionals describe the energetics of bond-dissociation reactions producing radicals? *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1095–1099.

- (28) Benson, S. W. *The Foundations of Chemical Kinetics*; McGraw-Hill: New York, 1960; Chapter XV, pp 504–508.

- (29) Alvarez-Idaboy, J. R.; Galano, A. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *126*, 75–85.

- (30) Sheng, X. W.; Mentel, L.; Gritsenko, O. V.; Baerends, E. J. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2896–2901.

- (31) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1203–1210.
- (32) Eyring, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107–115.
- (33) Evans, M. G.; Polanyi, M. Some applications of the transition state method to the calculation of reaction velocities, especially in solution. *Trans. Faraday Soc.* **1935**, *31*, 875–894.
- (34) Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. Current status of transition-state theory. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664–2682.
- (35) Truhlar, D. G.; Kuppermann, A. Exact Tunneling Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1840–1851.
- (36) Marcus, R. A. Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65*, 599–610.
- (37) Marcus, R. A. Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 13–29.
- (38) Nelsen, S. F.; Weaver, M. N.; Luo, Y.; Pladziewicz, J. R.; Ausman, L. K.; Jentzsch, T. L.; O’Konek, J. J. Estimation of Electronic Coupling for Intermolecular Electron Transfer from Cross-Reaction Data. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 11665–11676.
- (39) Collins, F. C.; Kimball, G. E. Diffusion-controlled reaction rates. *J. Colloid Sci.* **1949**, *4*, 425–437.
- (40) Smoluchowski, M. Mathematical theory of the kinetics of the coagulation of colloidal solutions. *Z. Phys. Chem.* **1917**, *92*, 129–168.
- (41) Truhlar, D. G. Nearly encounter-controlled reactions: The equivalence of the steady-state and diffusional viewpoints. *J. Chem. Educ.* **1985**, *62*, 104–106.
- (42) Einstein, A. On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1905**, *17*, 549–560.
- (43) Stokes, G. G. *Mathematical and Physical Papers*; Cambridge University Press: Cambridge, 1903; Vol. 3, esp. Sect. IV, p 55.
- (44) Tishchenko, O.; Truhlar, D. G.; Ceulemans, A.; Nguyen, M. T. A unified perspective on the hydrogen atom transfer and proton-coupled electron transfer mechanisms in terms of topographic features of the ground and excited potential energy surfaces as exemplified by the reaction between phenol and radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7000–7010.
- (45) Tishchenko, O.; Ilieva, S.; Truhlar, D. G. Communication: Energetics of reaction pathways for reactions of ethenol with the hydroxyl radical: The importance of internal hydrogen bonding at the transition state. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 021102.
- (46) Alecu, I. M.; Truhlar, D. G. A Computational Study of the Reactions of Methanol with the Hydroperoxyl and Methyl Radicals. 1. Accurate Thermochemistry and Barrier Heights. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 2811–2829.
- (47) Schultz, N.; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. Density Functionals for Inorganometallic and Organometallic Chemistry. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11127–11143.
- (48) Ellingson, B. A.; Theis, D. P.; Tishchenko, O.; Zheng, J.; Truhlar, D. G. Reactions of hydrogen atom with hydrogen peroxide. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 13554–13566.
- (49) Zhao, Y.; Tishchenko, O.; Gour, J. R.; Li, W.; Lutz, J. J.; Piecuch, P.; Truhlar, D. G. Thermochemical kinetics for multireference systems: Addition reactions of ozone. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 5786–5799.
- (50) Galano, A.; Francisco-Márquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. Canolol: A promising chemical agent against oxidative stress. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8590–8596.
- (51) Medina, M. E.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. Theoretical study on the peroxy radicals scavenging activity of esculetin and its regeneration in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 1197–1207.
- (52) Belcastro, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Structural and electronic characterization of antioxidants from marine organisms. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *115*, 361–369.
- (53) Leopoldini, M.; Russo, N.; Chiodo, S.; Toscano, M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6343–6351.
- (54) Leopoldini, M.; Rondinelli, F.; Russo, N.; Toscano, M. Pyranoanthocyanins: A theoretical investigation on their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8862–8871.
- (55) Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **2011**, *125*, 288–306.
- (56) León-Carmona, J. R.; Galano, A. Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4538–4546.
- (57) Bast, A.; Haenen, G. R. M. M. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 430–436.
- (58) Freisleben, H. J.; Tandian, D.; Kuebel-Thiel, K. Application of α -lipoic acid beyond peripheral diabetic polyneuropathy (A report of 3 cases). *Med. J. Indones.* **2011**, *20*, 143–148.
- (59) Tejero, I.; González-García, N.; González-Lafont, A.; Lluch, J. M. Tunneling in green tea: Understanding the antioxidant activity of catechol-containing compounds. A variational transition-state theory study. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5846–5854.
- (60) Inagaki, T.; Yamamoto, T. Critical role of deep hydrogen tunneling to accelerate the antioxidant reaction of ubiquinol and vitamin E. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 937–950.
- (61) Chiodo, S. G.; Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The inactivation of lipid peroxide radical by quercetin. A theoretical insight. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7662–7670.
- (62) Alberto, M. E.; Russo, N.; Grand, A.; Galano, A. A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: Mechanism, kinetics and influence of the environment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4642–4650.
- (63) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. Reactions of OOH radical with β -carotene, lycopene, and torulene: Hydrogen atom transfer and adduct formation mechanisms. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11338–11345.
- (64) Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. Theoretical study on the chemical fate of adducts formed through free radical addition reactions to carotenoids. *Theor. Chem. Acc.* **2010**, *127*, 595–603.
- (65) Iuga, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Vivier-Bunge, A. ROS initiated oxidation of dopamine under oxidative stress conditions in aqueous and lipidic environments. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12234–12246.
- (66) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M.; Medina, M. E. A quantum chemical study on the free radical scavenging activity of tyrosol and hydroxytyrosol. *Theor. Chem. Acc.* **2012**, *131*, 1173.
- (67) Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Francisco-Márquez, M. Physicochemical insights on the free radical scavenging activity of sesamol: Importance of the acid/base equilibrium. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13101–13109.
- (68) Galano, A.; Francisco-Márquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. Mechanism and kinetics studies on the antioxidant activity of sinapinic acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11199–11205.
- (69) Galano, A.; Pérez-González, A. On the free radical scavenging mechanism of protocatechuic acid, regeneration of the catechol group in aqueous solution. *Theor. Chem. Acc.* **2012**, *131*, 1265.
- (70) Galano, A.; Martínez, A. Capsaicin, a tasty free radical scavenger: Mechanism of action and kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 1200–1208.
- (71) Martínez, A.; Galano, A.; Vargas, R. Free radical scavenger properties of α -mangostin: Thermodynamics and kinetics of HAT and RAF mechanisms. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12591–12598.
- (72) Galano, A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 7178–7188.
- (73) Galano, A.; Francisco-Márquez, M. Peroxy-radical-scavenging activity of garlic: 2-Propenesulfenic acid versus allicin. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16077–16081.
- (74) Cordova-Gomez, M.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. Piceatannol, a better peroxy radical scavenger than resveratrol. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 20209–20218.