



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

ESTUDIO TEÓRICO DE LA CAPACIDAD PARA ATRAPAR
RADICALES LIBRES DE COMPUESTOS CON CÚMULOS METÁLICOS

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

PRESENTA:
MIGUEL REINA TAPIA

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. SERGUEI FOMINE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

DRA. ANNIA GALANO JIMÉNEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- IZTAPALAPA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2017



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.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Martínez,

Gracias por su amistad y su cariño, por sus enseñanzas y su paciencia. Han sido años fantásticos de un crecimiento profesional y personal enorme.

Gracias por recibirme en el Instituto y darme la oportunidad de trabajar a su lado, por el tiempo dedicado en mi formación académica, desde el propedéutico del Instituto hasta estos días en que voy a ser doctor.

Gracias por la beca como ayudante del SNI, por el librito que me encargó, por invitarme a dar clases al Subprograma 121 y luego por empujarme a seguir haciéndolo, por los diferentes congresos donde siempre aprendí mucho. Gracias por recomendarme para el Programa Pauta; por el primer artículo y por todos los demás, siempre quedará esa pequeña emoción y esa gran satisfacción.

Pero sobre todo gracias por haberse comprometido tanto conmigo, muchas veces, pero muchas veces, a pesar de mí mismo.

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

A CONACYT por la beca de doctorado.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales, por ser un espacio donde siempre me sentí feliz.

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

RESUMEN

En este trabajo teórico se estudiaron los cinco componentes principales de la mezcla de silimarina en términos de sus diferencias estructurales, electrónicas y de reactividad, y se analizó su capacidad antioxidante. El cuestionamiento principal de este trabajo fue el de determinar si la silibina, componente más abundante y estudiado de la silimarina, es también el mejor compuesto antioxidante de la mezcla. Para llevar a cabo este estudio, se optimizaron las geometrías de la silibina, la isosilibina, la silicristina, la silidianina y la taxifolina. Dado que estas moléculas a pH fisiológico se encuentran desprotonadas en 30% aproximadamente, también se estudiaron las especies desprotonadas de cada componente. Se observó que todas las moléculas tienen un comportamiento parecido cuando se analizan los mecanismos antioxidantes, por lo que se determinó que la silibina no es ni el componente más estable ni el más reactivo.

Dado que la interacción de nanopartículas metálicas con moléculas orgánicas incrementa las señales de los espectros Raman, se estudió si la interacción de átomos y cúmulos de cuatro átomos de Cu, Ag y Au con silibina producía un incremento en las señales del espectro Raman. De igual forma, se investigó la capacidad antioxidante de los sistemas con metales para observar cómo se veía modificada la reactividad y determinar si estos nuevos sistemas podrían mejorar la capacidad antioxidante de la silibina. Se concluyó que la presencia de átomos y cúmulos de Cu, Ag y Au puede funcionar como una técnica analítica para detectar silibina en los espectros Raman, pues la presencia de metales produce un incremento de las señales. Además, los sistemas con metales tienen una mayor capacidad antioxidante que la silibina.

También se investigó la capacidad de la silibina para atrapar especies de Cu comparándola con su capacidad para atrapar el radical libre $\bullet\text{OH}$. Se comparó el desempeño antioxidante de la silibina con otras moléculas antioxidantes conocidas como la astaxantina, la melatonina y uno de sus metabolitos. Se concluyó que ninguna de las moléculas analizadas podría quelatar Cu en presencia del radical libre $\bullet\text{OH}$.

ABSTRACT

In this theoretical work, major components of silymarin (a mixture) were studied in terms of their structural, electronic and reactive differences to analyze their antioxidant capacities. The principle interest of this investigation is to determine whether the silybin, the most abundant and studied component of silymarin, is as well the most efficient antioxidant compound of the mixture. To this purpose, the geometries of silybin, isosilybin, silychristin, silydianin and taxifolin were optimized. At physiological conditions all these molecules are de-protonated (approximately 30%), the de-protonated species of each component were also considered. The study of the antioxidant properties of these molecules showed that all have a similar behavior. From these results, it is possible to conclude that silybin is neither the most stable nor the most reactive component of silymarin.

The interaction of atoms and metal clusters of four atoms of Cu, Ag and Au with silybin was studied to analyze the Raman spectra, since it is well known that the interaction of metallic nanoparticles with organic molecules increases the signal of the Raman spectra. In addition, the antioxidant capacity of these systems with metals was investigated to determine if these new systems enhance the antioxidant capacity of silybin. The presence of metals increase the Raman signals, and therefore it could be used as an analytic technique to detect silybin in the Raman spectra. Furthermore, the systems with atoms and metal cluster have a higher antioxidant capacity than silybin.

The capacity of silybin to scavenge Cu species and the $\bullet\text{OH}$ free radical was investigated. The antioxidant capacity of silybin was compared to other known molecules such as asthaxantin, melatonin and one of its metabolites. According to our results, it is possible to conclude that none of the analyzed molecules could chelate Cu in the presence of $\bullet\text{OH}$.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	13
3. OBJETIVOS	19
4. MARCO TEÓRICO	21
I. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD	23
II. FUNCIONAL M06	27
III. PSEUDOPOTENCIAL Y BASES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
I. DETALLES COMPUTACIONALES	36
II. COMPONENTES PRINCIPALES DE LA SILIMARINA	41
III. INTERACCIÓN DE ÁTOMOS Y CÚMULOS METÁLICOS CON SILIBINA	52
IV. SISTEMAS SIL-M ₄ (M=Cu, Ag, Au)	64
V. ¿ <i>ATRAPADORES</i> DE Cu O DE RADICALES LIBRES?	75
6. CONCLUSIONES	90
7. PERSPECTIVAS	91
8. BIBLIOGRAFÍA	92
ARTÍCULOS PUBLICADOS	108

1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones, con uno o más electrones desapareados que se caracterizan por ser altamente reactivos y algunos de ellos tienen la particularidad de producir reacciones en cadena.^{1,2}

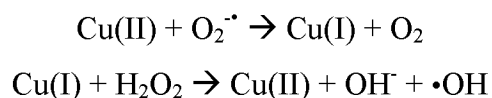
En las concentraciones adecuadas, los radicales son importantes para el correcto funcionamiento del organismo. Se sabe que participan en la señalización celular y en la apoptosis de células defectuosas.^{3,4} Sin embargo, cuando la concentración es elevada, los radicales libres son tóxicos para los sistemas vivos. Para referirse a los radicales libres, la máxima de Paracelso “la dosis hace el veneno” parece convenir con exactitud.

La formación de radicales libres es continua en el cuerpo humano. En el organismo, los radicales libres se generan en su mayoría en la mitocondria de las células⁵⁻⁷ como consecuencia de la producción de ATP (adenosina trifosfato) y se derivan del consumo del oxígeno necesario para generar energía en la célula.⁵ Se ha reportado que la mitocondria es la fuente fisiológica más importante de radicales libres de oxígeno, pues se generan entre dos y tres nanomoles del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por minuto y por miligramo de proteína.⁸ Los radicales libres también pueden formarse debido al estrés fisiológico provocado por la contaminación ambiental como la quema de combustibles fósiles, o por hábitos de consumo nocivos como fumar o la ingesta exagerada de alcohol.⁹⁻¹²

La mayoría de los radicales libres generados en el cuerpo humano son radicales libres de oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés).¹³ De los radicales libres de oxígeno, el $\cdot OH$ es el más reactivo y electrofílico, y por lo tanto es el más oxidante de todos.¹⁴ Su reactividad es tan alta y su selectividad tan baja que reacciona con prácticamente cualquier molécula casi al mismo tiempo que se forma, pues su vida media es muy corta (10^{-9} s) y su cinética muy elevada ($\geq 10^9$ M/s).^{14,15} por lo que también se le considera el radical libre más nocivo. Se estima que el radical libre $\cdot OH$ es

responsable del mayor daño oxidativo en el ADN.¹⁶ Otras especies reactivas de oxígeno son los radicales alcoxilos (RO•), cuya reactividad es menor que la del radical hidroxilo pero mayor que la de los radicales peroxilos (ROO•), con excepción del radical libre hidroxiperoxilo (•OOH).¹⁷

La presencia de especies metálicas de Fe o Cu en el organismo también puede originar la producción de radicales libres. A nivel intracelular, una de las reacciones más importantes de formación del radical libre •OH es a través de la reacción de Haber-Weiss catalizada por cationes metálicos. En el segundo paso de este proceso también participa la reacción de Fenton. Dado que la reacción de Fenton es más lenta,¹⁸ la que tiene más relevancia fisiológica es la primera reacción del proceso, como se muestra a continuación con el Cu como ejemplo:



En esta reacción el Cu(II) actúa como un catalizador que se consume y se vuelve a generar y, como consecuencia, se pueden producir grandes cantidades de •OH.

La reacción de Haber-Weiss catalizada por iones metálicos se puede estudiar indistintamente con las especies de Fe o Cu pero se ha reportado que, en condiciones experimentales similares, el cobre es más tóxico en términos de estrés oxidativo que el hierro.^{19,20} En promedio, el hígado de una persona adulta contiene de 18 a 45 microgramos de Cu por gramo, mientras que en la sangre hay aproximadamente seis miligramos de Cu.^{21,22} Como para muchas sustancias, la presencia de Cu puede ser benéfica o tóxica para la salud humana dependiendo de la concentración.²³

Aunque la existencia de los radicales libres se conoce desde hace más de cincuenta años,²⁴ sus efectos sobre la salud y sus implicaciones sólo se han estudiado intensamente durante las últimas dos décadas. Una concentración excesiva de radicales libres es perjudicial para el cuerpo humano. Para regular la cantidad de radicales libres hay sustancias llamadas

antioxidantes. Un antioxidante es aquella sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo.²⁵ Los antioxidantes tienen como principal característica química la de atrapar a los radicales libres, y también tienen efectos antimicóticos, antibacteriales, antivirales, antiinflamatorios, anticancerígenos, anticoagulantes, antitumorales, analgésicos y hepatoprotectores, por mencionar sólo los ejemplos más importantes.²⁶⁻⁴²

La clasificación de los antioxidantes está sujeta al contexto en el que se estudien. Con base en la forma de producción o de obtención, pueden ser endógenos o exógenos. Los antioxidantes endógenos se originan en el propio organismo y los exógenos se adquieren del exterior.

Los antioxidantes endógenos son parte de la maquinaria del cuerpo humano y se dividen en enzimáticos y no enzimáticos. Como ejemplos destacados están tres enzimas primarias (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), y otras moléculas como el glutatión, la vitamina A y la melatonina.⁴³⁻⁴⁷ Los antioxidantes exógenos son por ejemplo los carotenoides y algunas vitaminas. Igual que los endógenos, ayudan a remover y retardar la aparición de radicales libres. Se encuentran principalmente en la dieta o en suplementos alimenticios.^{48,49}

En la Figura 1.1 se presenta un diagrama que reporta de forma general las moléculas antioxidantes exógenas clasificadas con base en sus características estructurales. La capacidad antioxidante que tiene una molécula está determinada principalmente por su concentración y por su reactividad intrínseca, mientras que aspectos como la naturaleza del radical libre, el medio de reacción o el pH determinan muchas veces el mecanismo principal de acción.¹ Las chalconas están constituidas por una cetona y un doble enlace que conectan dos anillos aromáticos. Los estilbenos se caracterizan por tener un doble enlace que une dos anillos aromáticos.⁵⁰ El máximo exponente de esta familia es el resveratrol con una alta actividad protectora.^{31,32} Las cumarinas son metabolitos secundarios de las plantas y pertenecen a la familia de benzopironas. Los ácidos fenólicos están conformados por un ácido carboxílico aromático y un grupo hidróxido; se ha reportado que el ácido cafeico perteneciente a esta familia es uno de los antioxidantes más consumidos en Estados

Unidos.³⁷ Los carotenoides se encuentran presentes en cantidades abundantes en las frutas y verduras, dándoles color naranja, amarillo y rojo. Se caracterizan por la larga cadena de dobles enlaces conjugados que se enlazan a dos anillos de seis miembros. Las vitaminas también han sido descritas como buenos agentes antioxidantes y se identifican por los grupos funcionales oxano.

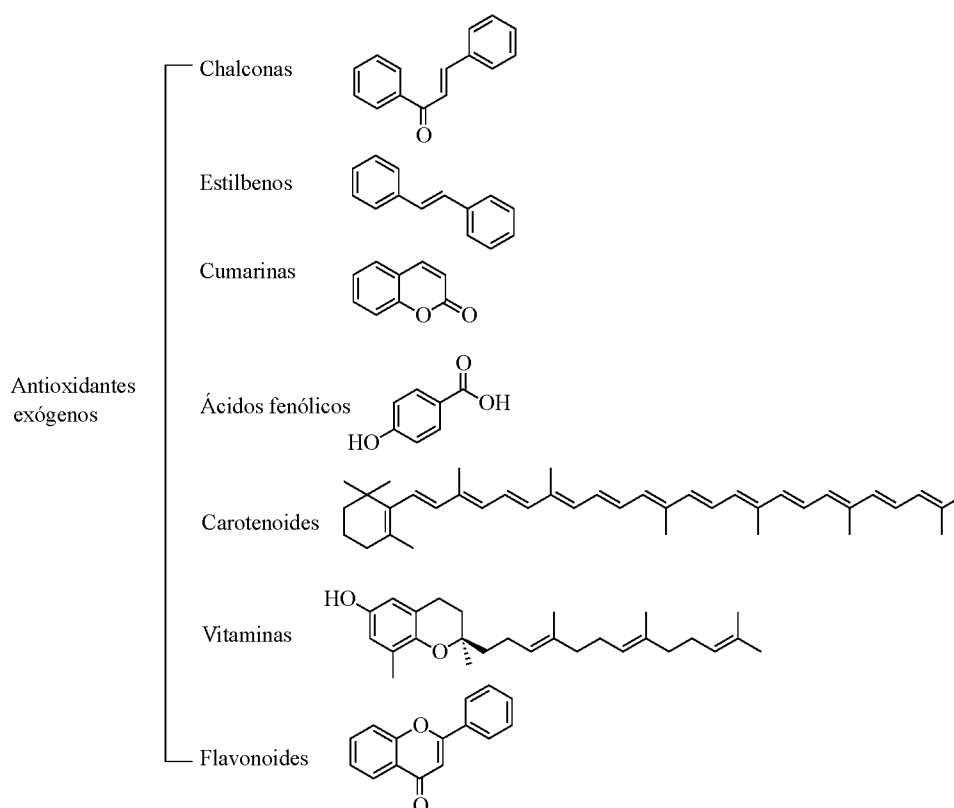


Figura 1.1. Clasificación de las principales familias de antioxidantes exógenos.

En este trabajo se estudian algunas moléculas antioxidantes de la familia de los flavonoides, que se ha probado que tienen una importante capacidad para atrapar radicales libres.⁵¹⁻⁶³ Son los que se consumen en mayor cantidad comparado con las vitaminas y los carotenoides, y se estima que hay 8,000 compuestos pertenecientes a esta familia.⁶⁴ Están presentes en las plantas y son responsables del color amarillo, rojo o azul de las flores.^{65,66} La estructura química de los flavonoides presenta dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico intercalado como se observa en la Figura 1.1. Los flavonoides presentan actividad biológica y farmacéutica de interés general para la salud humana,⁶⁷ por lo que su estudio se ha acrecentado en los últimos 60 años.

Sin importar su estructura química, los antioxidantes reaccionan de dos formas distintas, cumpliendo las funciones de prevención y protección. En los mecanismos de prevención los antioxidantes impiden la formación de radicales libres de forma indirecta mediante la quelatación de metales como Fe y Cu en sus distintos estados de oxidación. Por otro lado, en los mecanismos de protección los antioxidantes eliminan y atrapan radicales libres mediante reacciones químicas. A través de estos mecanismos se reduce uno de los principales efectos que producen los radicales libres en exceso, conocido como el estrés oxidativo que se explica a continuación.

El exceso de radicales libres en el organismo aumenta la probabilidad de que éstos reaccionen con sustratos biomoleculares de gran importancia como son las proteínas, los lípidos o el ADN oxidándolos.⁶⁸ Este tipo de interacciones pueden producir enfermedades y daños en el organismo, lo que se conoce como estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un fenómeno dañino y se sabe que está relacionado con diversas enfermedades, entre las que destacan los desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, el mal de Parkinson o la depresión, enfermedades cardiovasculares, oculares, renales y pulmonares, diabetes, VIH, y algunos tipos de cáncer por mencionar sólo algunas. Se estima que el estrés oxidativo está directa o indirectamente relacionado con aproximadamente cien enfermedades distintas.⁶⁹⁻⁸²

En resumen, el estrés oxidativo surge cuando hay un exceso de radicales libres, lo que sucede cuando se rompe el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la cantidad de antioxidantes en el organismo.⁸³

Para atrapar radicales libres se han reconocido varios mecanismos de reacción directos y secuenciales. Por un lado, la transferencia electrónica, la transferencia de un átomo de hidrógeno, la formación de un aducto radical son mecanismos directos, en los que el antioxidante reacciona directamente con el radical libre. Por otro lado, en los mecanismos secuenciales, el antioxidante sufre un cambio químico, generalmente la pérdida de un protón, antes de interactuar con el radical.⁸⁴⁻⁸⁶ Aunque los mecanismos secuenciales han demostrado ser en algunos casos la vía principal de los antioxidantes,⁸⁷⁻⁸⁹ en este trabajo solamente se estudiarán los mecanismos directos de reacción.

El mecanismo de transferencia electrónica consiste en aparear el electrón del radical libre donándole un electrón. También se ha reconocido que los antioxidantes pueden estabilizar el radical libre aceptando el electrón que está desapareado. En cualquier caso, el antioxidante queda con un electrón desapareado que por su mayor tamaño molecular y por sus propiedades estructurales particulares (anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados), se deslocaliza en toda la molécula, y esto hace que su reactividad sea mucho menor que la del radical libre. Este mecanismo se encuentra regulado por el carácter aceptor del radical libre y por el carácter donador del antioxidante, o viceversa.⁹⁰

En el segundo mecanismo, la transferencia de un átomo de hidrógeno, el antioxidante le cede un átomo de hidrógeno al radical libre. Con esto se evita tener electrones desapareados por lo que la reactividad disminuye y decimos que se estabiliza. Este mecanismo ha sido reportado como crucial para numerosas moléculas antioxidantes, especialmente compuestos fenólicos entre los que destacan la capsaicina, el ácido elálgico y sus derivados, y la silibina entre otros.⁹¹⁻⁹³ Se sabe que este mecanismo es muy importante en medios lipídicos, y que en medios acuosos su importancia está regida por el pKa del sistema antioxidante y el pH del medio. Cuando el pH es menor que el pKa del compuesto, la molécula no se encuentra desprotonada y este mecanismo puede ser el principal. Por otro lado, si el pH es mayor que el pKa del antioxidante, la molécula se encontrará desprotonada y según los artículos consultados, este mecanismo no será el principal.⁹⁴

El tercer mecanismo, conocido como la formación del aducto radical, estabiliza un radical libre mediante la unión con un antioxidante. El aducto radical es una especie química con un electrón desapareado pero éste se deslocaliza en todo el sistema y por lo mismo, la reactividad es menor.⁹⁵

Por último, la quelatación de metales es una forma de inhibir y prevenir el estrés oxidativo evitando la formación de radicales libres porque metales como Fe y Cu son catalizadores en la reacción de Haber-Weiss.¹⁸

La habilidad de los sistemas antioxidantes para quelatar especies metálicas no se limita a las de Fe y Cu en sus diferentes estados de oxidación. Se ha estudiado la quelatación de diferentes metales por cuestiones de toxicidad como la quelatación de la astaxantina con cationes de Hg^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} e incluso con cúmulos metálicos.^{96,97} Este tipo de interacciones con metales pueden ser muy interesantes pues las propiedades antioxidantes cambian.

En este trabajo se utilizan los cuatro mecanismos directos de reacción para investigar la capacidad de atrapar radicales libres de antioxidantes exógenos y endógenos. Los sistemas de estudio son la silibina y otros flavonoides, la astaxantina, la melatonina y uno de sus metabolitos, la ciclo 3-hidroxi melatonina (3OHM).

2. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, nuestros sistemas de estudio son la silibina (SIL) y otros flavonoides, la astaxantina (ASTA), la melatonina (MELA) y uno de sus metabolitos, la ciclo 3-hidroximelatonina (3OHM). Sobre estos sistemas se han reportado algunos resultados que se exponen a continuación. En particular para la SIL, el trabajo de maestría previo a esta investigación incluyó un análisis extenso.⁹⁸ Por esta razón, en estos antecedentes se presenta un resumen más completo para la silibina que para los otros sistemas estudiados.

El cardo mariano (*S. marianum* (L.) Gaertn., *Asteraceae*)⁹⁹ es una planta identificada en las épocas de la antigua Grecia, cuyas propiedades medicinales fueron descritas por primera vez por los naturalistas renacentistas. Ha recibido mucha atención entre los investigadores durante la última década debido a sus propiedades terapéuticas,⁹⁸⁻¹¹⁷ sobre todo como un remedio herbolario para males relacionados con el hígado,¹⁰¹⁻¹⁰³ y por sus propiedades antiinflamatorias,¹⁰⁵ anticancerígenas¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ y antioxidantes.^{108,109}

La sustancia activa del cardo mariano es una mezcla compleja de flavonoides llamada silimarina.^{100,110} Los flavonoides son a su vez una familia de compuestos que presentan propiedades benéficas para la salud.^{51-67,93,118} Se sabe que hay una fuerte correlación entre la actividad biológica de los flavonoides y su capacidad antioxidante. Estas moléculas pueden estabilizar radicales libres y reducir el estrés oxidativo mediante diversos mecanismos.⁸³ El componente más abundante y más ampliamente estudiado de la silimarina es la silibina (SIL, Figura 2.1).¹⁰⁰

La SIL se utiliza frecuentemente en suplementos alimenticios, cosméticos y dermatológicos, y se sabe que las propiedades antioxidantes de la SIL son en parte las responsables de su acción protectora. La capacidad de atrapar radicales libres de la SIL se ha investigado teórica y experimentalmente.¹¹⁸⁻¹²⁶

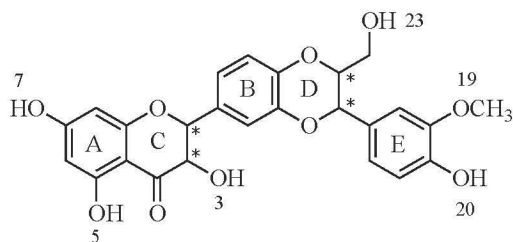


Figura 2.1. Estructura molecular de la SIL con la numeración basada en la IUPAC. Con estrellas (*) se presentan los cuatro centros quirales de la molécula.

La silibina es a su vez una mezcla racémica de diastereoisómeros, silibina A y silibina B (Figura 2.2).⁶⁵

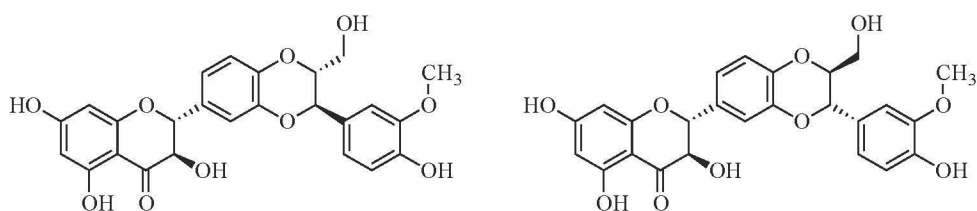


Figura 2.2. Estructuras moleculares de silibina A y Silibina B respectivamente.

En la molécula de SIL hay cinco grupos -OH , tres de tipo fenólico en las posiciones R_7 , R_5 y R_{20} , uno secundario en la posición R_3 y otro primario en la posición R_{23} . El grupo -OH en R_3 puede oxidarse incluso con el oxígeno atmosférico y dar origen al compuesto 2,3-dehidrosilibina que es un importante derivado de la silibina (Figura 2.3).⁶⁵

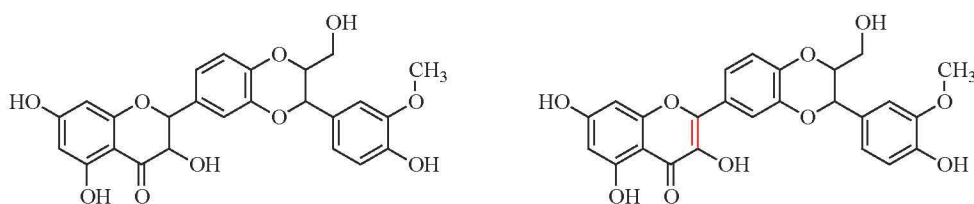


Figura 2.3. Estructuras moleculares de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina, respectivamente.

La conversión de SIL en el derivado 2,3-dehidrosilibina es un proceso muy estudiado. La principal pregunta sin contestar es si este derivado es un componente natural presente en la silimarina o si se produce —en muy pequeñas cantidades— por reacciones de la silibina con oxígeno.⁶⁵ Además, el derivado 2,3-dehidrosilibina presenta propiedades fisicoquímicas distintas y una actividad biológica diferente a la SIL.⁹³

En el estudio previo que antecede a esta investigación se analizaron las propiedades antioxidantes de la SIL y la 2,3-dehidrosilibina. La diferencia estructural y electrónica que supone el doble enlace en los carbonos C2 y C3 de la 2,3-dehidrosilibina (Figura 2.3) tiene importancia cuando se investigan procesos que involucran radicales libres. El doble enlace genera una estructura prácticamente plana por lo que hay mayor deslocalización de electrones.^{93,98}

Por lo mismo, la 2,3-dehidrosilibina tiene una mayor capacidad para atrapar radicales.^{65,93} Se ha reportado que el mecanismo principal de inhibición de radicales libres para la SIL es la transferencia electrónica, mientras que la transferencia de átomo de hidrógeno es predominante para 2,3-dehidrosilibina.⁹³ La influencia de los pKa de los sistemas también es un factor determinante en la capacidad antioxidante de estos compuestos.

La comparación de las moléculas de la SIL y de la 2,3-dehidrosilibina constituyó el punto de inicio de este trabajo teórico. Además, el estudio contempló las especies más abundantes a pH fisiológico, y algunos derivados metilados de ambas moléculas.

La SIL es una molécula que a pH fisiológico está desprotonada en casi 30%.^{121,122} Por este motivo es importante tomar en cuenta la forma desprotonada en los diversos estudios. En la Figura 2.4 se muestran las fórmulas estructurales de la SIL y de su forma desprotonada ($[SIL_{(-H)}]^{-1}$).

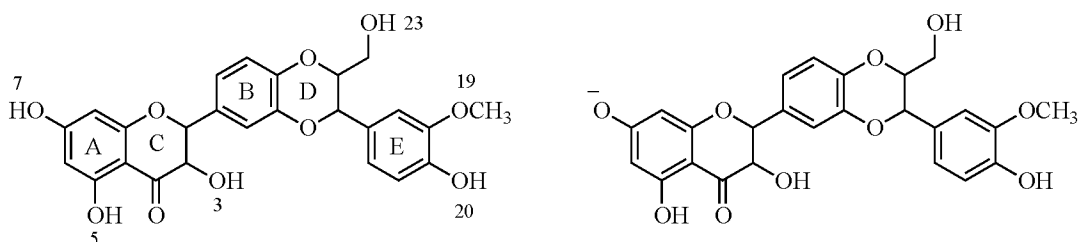


Figura 2.4. Fórmulas estructurales de la silibina (SIL) y la silibina desprotonada $[SIL_{(-H)}]^{-1}$. Se presenta la numeración de los grupos hidroxilo y las etiquetas de los anillos aromáticos y heterociclos de acuerdo con las reglas de la IUPAC.

En la Figura 2.5 se presentan las fórmulas estructurales de la silibina y la 2,3-dehidrosilibina y sus geometrías optimizadas. Se destaca la importancia de los puentes de

hidrógeno porque, para ambas moléculas, la estructura más estable presenta tres puentes de hidrógeno intramoleculares.^{93,98} Los mecanismos de transferencia electrónica, de transferencia de átomo de hidrógeno y de formación de aductos radicales se estudiaron considerando las especies más abundantes de la SIL y la 2,3-dehidrosilibina a pH fisiológico.

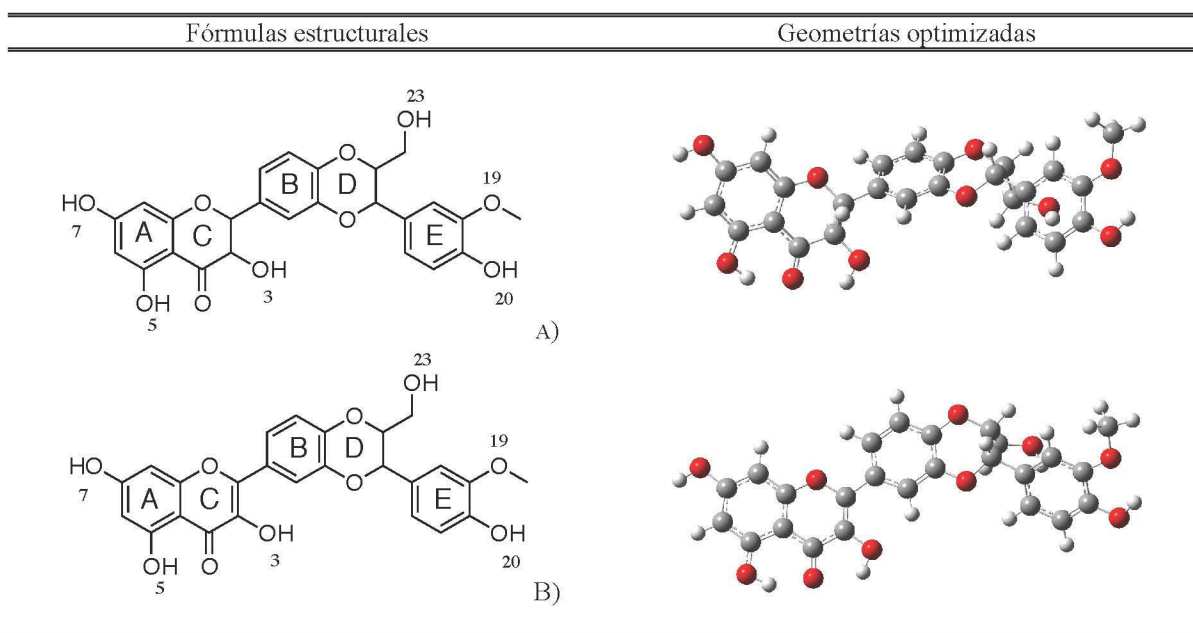


Figura 2.5. Estructuras molecular y geometría optimizada de silibina A) y 2,3-dehidrosilibina B).

Se encontró que la 2,3-dehidrosilibina es mejor donador y aceptor de electrones que la SIL. Al tomar en cuenta las especies desprotonadas, se concluyó que éstas son mejores donadoras y peoresceptoras de electrones que las no desprotonadas, y que la 2,3-dehidrosilibina desprotonada es mejor donadora que la SIL desprotonada. Este resultado es importante porque en condiciones fisiológicas, la 2,3-dehidrosilibina se encontrará desprotonada, con lo cual su capacidad para donar y aceptar electrones es mayor y por lo tanto su capacidad antioxidante.

En el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno se estudió termodinámicamente la abstracción de un átomo de hidrógeno. Los valores en el cambio de energía para la reacción de transferencia de átomo de hidrógeno indican que las reacciones son endergónicas, y por lo mismo estas reacciones no están favorecidas.

Considerando el mecanismo de formación del aducto radical, el radical libre $\bullet\text{OOH}$ se enlazó sistemáticamente a todos los átomos de carbono que forman dobles enlaces y a los átomos de oxígeno que pudieran formar puentes de hidrógeno entre el radical libre y las moléculas de estudio. En este caso se analizó la energía necesaria para disociar el $\bullet\text{OOH}$. Valores positivos de la diferencia de energía indican que la formación del aducto radical está favorecida. Se analizaron dos parámetros relacionados con este mecanismo. Por un lado, el número de posiciones donde la diferencia de energía era positiva y por lo tanto el aducto radical favorecido termodinámicamente y por otro, los valores de ΔG_{RAF} . Se encontró que la SIL forma menos aductos radicales estables que la 2,3-dehidrosilibina, y que la especie desprotonada de la 2,3-dehidrosilibina es mejor que su análoga sin desprotonar.

La ASTA, otro de los sistemas que se estudian en este trabajo, es un antioxidante reconocido que atrapa radicales libres por diferentes mecanismos.^{39,127} Además, esta molécula de la familia de los carotenoides tiene la capacidad de quelatar varios iones metálicos que producen estrés oxidativo, ya sea por su participación en la formación de radicales libres como el Cu(II) o porque son contaminantes para el organismo como Hg(II), Pb(II) y Cd(II).⁹⁶ La ASTA se estudió para comparar la capacidad antioxidante de la SIL.

La investigación de esta tesis también contempla el análisis de la melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), una neuro-hormona secretada por la glándula pineal y la retina, relacionada con los ritmos circadianos.^{128,129} La melatonina ha demostrado ser un potente antioxidante endógeno debido a su capacidad para atravesar las distintas barreras fisiológicas,^{46,47,130} y se ha reportado consistentemente su capacidad para reducir el estrés oxidativo.¹³¹⁻¹³⁷ Uno de los aspectos más interesantes de la melatonina es que sus metabolitos también son buenos sistemas atrapadores de radicales libres.¹³⁸⁻¹⁴⁰ A este fenómeno se le llama cascada antioxidante y es lo que hace de la melatonina un buen antioxidante incluso a bajas concentraciones.¹⁴¹ En esta tesis se estudia la melatonina y también su metabolito cíclico 3-hidroximelatonina (3OHM), que presenta una probada actividad antioxidante.¹⁴² Hay estudios teóricos de la melatonina y su metabolito 3OHM, en donde se señala que el mecanismo principal para estas dos moléculas es la transferencia de

átomo de hidrógeno.^{47,142} Además, ambas moléculas han sido reportadas como buenos agentes quelatantes de Cu(I) y Cu(II).¹⁴³ Pese a estos estudios, en ninguno se analiza la comparación entre la capacidad para atrapar Cu y la capacidad para estabilizar el radical libre •OH, que se genera en la reacción de Haber-Weiss.

3. OBJETIVOS GENERALES

- ❖ Investigar la capacidad para atrapar radicales libres de los componentes principales de la silimarina.
- ❖ Investigar la capacidad antioxidante de la SIL y su especie desprotonada interaccionando con átomos y cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au.
- ❖ Comparar la capacidad antioxidante de distintas moléculas que pueden reaccionar con Cu y con el radical libre $\bullet\text{OH}$ interfiriendo en el equilibrio de la reacción de Haber-Weiss.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Analizar la capacidad antioxidante de los componentes principales de la silimarina e investigar cuál es el mejor antioxidante de la mezcla.
- ❖ Estudiar cómo se afectan las propiedades fisicoquímicas (espectros Raman) de la SIL cuando se enlaza con átomos y cúmulos metálicos.
- ❖ Determinar cómo cambia la capacidad antioxidante de la SIL por la presencia de metales.
- ❖ Establecer comparativamente la importancia de atrapar Cu frente a la de neutralizar el radical libre $\bullet\text{OH}$.
- ❖ Indagar la capacidad antioxidante de distintas moléculas previamente reportadas como la SIL, la ASTA, la MELA y la 3OHM, con el fin de determinar sus mecanismos de acción principales.

4. MARCO TEÓRICO

La química teórica se basa en modelos matemáticos y físicos para simular, predecir y explicar los sistemas químicos. La ecuación matemática de Erwin Schrödinger propuesta en 1926 supone un hito en la historia de la física moderna al describir la evolución de una partícula microscópica a través del tiempo. La ecuación de Schrödinger no relativista independiente del tiempo para N electrones y M núcleos se expresa como:

$$\hat{H}\Psi_i(\vec{x}_1, \vec{x}_1, \dots, \vec{x}_N, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_M) = E_i\Psi_i(\vec{x}_1, \vec{x}_1, \dots, \vec{x}_N, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_M) \quad (4.1)$$

La función de onda, ψ , no tiene un significado físico y su valor puede ser complejo o negativo; sin embargo la interpretación estadística de la función de onda realizada por Max Born sí tiene un significado físico. El término $|\psi|^2$ es real y positivo y representa la densidad de probabilidad de encontrar la partícula en un espacio determinado. E_i es el valor numérico de la energía que corresponde al estado descrito por la función de onda ψ_i . El operador de energía total o hamiltoniano, \hat{H} , describe la energía cinética y potencial del sistema y se expresa como:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad (4.2)$$

Los primeros dos términos hacen referencia a la energía cinética de los electrones y de los núcleos, mientras que los otros tres términos describen la interacción atractiva entre los núcleos y los electrones, y las interacciones repulsivas entre los electrones y los núcleos, respectivamente. Los valores A y B indican la cantidad de núcleos (el máximo es M), mientras que i y j representan a los electrones. El operador Laplaciano se aplica sobre la función de onda y tiene la siguiente forma:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (4.3)$$

Debido a que la velocidad de los núcleos es mucho menor que la de los electrones, se puede considerar el sistema molecular como constituido por núcleos estáticos y electrones móviles. De esta forma la energía cinética de los núcleos no se toma en cuenta porque es mucho menor que la de los electrones. A esto se le conoce como la aproximación de Born-Oppenheimer, y con esta aproximación se puede reescribir el hamiltoniano del sistema como un hamiltoniano electrónico (\hat{H}_{elec}) más una contribución de repulsión electrostática de los núcleos, (\hat{V}_{NN}):

$$\hat{H}_{elec} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} = \hat{T} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee} \quad (4.4)$$

$$\hat{V}_{NN} = \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad (4.5)$$

De esta forma se puede llevar a cabo una separación de variables y expresar la energía total del sistema como la suma de la energía electrónica y nuclear:

$$E_{Tot} = E_{elec} + \hat{V}_{NN} \quad (4.6)$$

De esta forma la ecuación de Schrödinger ahora se escribe como

$$(\hat{H}_{elec} + \hat{V}_{NN})\psi = E\psi \quad (4.7)$$

El gran inconveniente de la ecuación de Schrödinger es que no existe una solución analítica para el problema de más de dos cuerpos, por lo que hay que utilizar soluciones aproximadas. El método variacional se basa en el principio variacional y es una buena herramienta para estados estacionarios. El principio variacional establece que dado un sistema de hamiltoniano, \hat{H} , si Φ es cualquier función normalizada de prueba, entonces:

$$\int \phi^* \hat{H} \phi d\tau \geq E_0 \quad (4.8)$$

Donde E_0 es el valor propio mínimo de \hat{H} . Esto quiere decir que cualquier función normalizada va a proporcionar un valor esperado de la energía mayor o igual que el valor exacto de la energía del estado fundamental.

Con el fin de encontrar soluciones que permitan hacer cálculos de estructura electrónica que contemplen la interacción de muchos cuerpos, en 1964 se desarrolló la Teoría de Funcionales de la Densidad como se explica a continuación.

I. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD

La Teoría de Funcionales de la Densidad se basa en los trabajos de Thomas y Fermi realizados en 1927, en los que se establecen los argumentos necesarios para sustituir la función de onda de $4N$ variables por una nueva variable fundamental, la densidad electrónica, ρ . A diferencia de la función de onda, la densidad electrónica puede medirse experimentalmente.

El modelo de Thomas-Fermi emplea la densidad electrónica para obtener información sobre átomos y moléculas considerando el modelo de un gas uniforme de electrones y asume de manera clásica las interacciones núcleo-electrón y electrón-electrón.

Sin embargo, para que la Teoría de Funcionales de la Densidad tomara la forma en la que hoy se conoce hubo que esperar hasta 1964 cuando Hohenberg y Kohn¹⁴⁵ postularon los dos teoremas fundamentales de esta teoría. El primer teorema establece que el potencial externo del sistema, $V_{ext}[\rho]$, es un funcional único de la densidad electrónica, ρ . La energía del estado basal del sistema se encuentra determinada por la densidad electrónica de ese estado, (ρ_0) . Esto se puede escribir de la siguiente forma:

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + V_{ext}[\rho_0] \quad (4.9)$$

$V_{ext}[\rho_0]$ representa el potencial externo mientras que $T[\rho_0]$ y $E_{ee}[\rho_0]$ corresponden a los funcionales de la energía cinética y de la interacción electrón-electrón. Estos dos funcionales son independientes del potencial externo por lo que pueden agruparse en un solo término:

$$F_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] \quad (4.10)$$

$F_{HK}[\rho_0]$ se conoce como el funcional universal de Hohenberg y Kohn, y representa el aspecto más importante de la Teoría de Funcionales de la Densidad. De conocerse se podría conocer la energía del estado basal de forma exacta y no aproximada. El funcional de la interacción electrón-electrón se puede separar en dos términos:

$$E_{ee}[\rho_0] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{XC}[\rho_0] = J[\rho_0] + E_{XC}[\rho_0] \quad (4.11)$$

$J[\rho_0]$ se refiere a la expresión de repulsión Coulómbica clásica y $E_{XC}[\rho_0]$ representa la interacción no clásica, conocida como la energía de intercambio y correlación electrónica. Con base en esto, la expresión del funcional universal de Hohenberg y Kohn se puede expresar como:

$$F_{HK}[\rho_0] = T[\rho_0] + J[\rho_0] + E_{XC}[\rho_0] \quad (4.12)$$

El segundo teorema se enfoca en determinar cómo una cierta densidad electrónica de prueba, $\tilde{\rho}$, puede corresponder a la densidad electrónica del estado basal. Este teorema se relaciona con el principio variacional y se puede formular como:

$$E_0 \leq E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{Ne}[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] \quad (4.13)$$

Esto quiere decir que sólo cuando se introduce la densidad electrónica exacta del estado base se encontrará la energía de ese estado.

Los teoremas de Hohenberg y Kohn son la base de la Teoría de Funcionales de la Densidad. Sin embargo, el mayor reto dentro de esta teoría está en conocer la forma exacta del funcional universal.

Para calcular la energía de un sistema a partir de la densidad electrónica, Kohn y Sham retomaron algunas de las ideas del esquema de Hartree-Fock y propusieron una aproximación que permite desarrollar de forma práctica estos teoremas.¹⁴⁹ La ingeniosa idea de Kohn y Sham es la introducción de un sistema de N-electrones no interactuantes donde cada electrón experimenta el mismo potencial externo. En el sistema de N-electrones no interactuantes, se puede escribir la energía cinética exacta como:

$$T_s = -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle \quad (4.14)$$

De esta forma, Kohn y Sham pueden reescribir el funcional universal como:

$$F[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad (4.15)$$

Donde E_{XC} es el funcional que contiene toda la información que no se conoce del sistema, y se puede expresar como:

$$E_{XC}[\rho] \equiv (T[\rho] - T_s[\rho]) + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]) = T_R[\rho] - E_{XC}[\rho] \quad (4.16)$$

Este funcional comprende las interacciones no clásicas y también la energía cinética residual, T_R , que corresponde a la diferencia de la energía cinética total del sistema menos la energía cinética del sistema de N-electrones no interactuantes. En este modelo, sólo T_s se puede calcular exactamente.

Como ya se explicó anteriormente, uno de los mayores problemas de la Teoría de Funcionales de la Densidad es que no se conoce exactamente el funcional universal exacto, es decir el funcional de la energía de intercambio y correlación, por lo que se utilizan diversas aproximaciones. El otro gran inconveniente es que no hay una forma sistemática

de mejorar su descripción, por lo que los resultados obtenidos con estos funcionales aproximados se comparan con datos experimentales para ajustarse. Entre las aproximaciones al funcional de intercambio y correlación (E_{XC}), se encuentran la aproximación de la densidad local (LDA), la aproximación generalizada de gradiente corregido (GGA), los funcionales híbridos y los meta-GGA.

La aproximación de la densidad local (LDA) se basa en el modelo del gas de electrones uniformes donde se concibe que el número de electrones N y el volumen V tienden a infinito, y por lo tanto la densidad electrónica es una constante. En esta aproximación el funcional de intercambio y correlación se escribe como:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\vec{r}) \varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r})) d\vec{r} \quad (4.17)$$

$\varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r}))$ es la energía de intercambio y correlación por partícula en el gas de electrones uniforme de densidad $\rho(\vec{r})$. Esta energía puede separarse en dos términos, uno para el intercambio y otro para la correlación:

$$\varepsilon_{XC}(\rho) = \varepsilon_X(\rho) + \varepsilon_C(\rho) \quad (4.18)$$

La aproximación generalizada de gradiente corregido analiza la densidad electrónica y su gradiente. La intención de este procedimiento es dar cuenta de las posibles variaciones en la densidad electrónica. El funcional de intercambio y correlación para esta aproximación se expresa como:

$$E_{XC}^{GGA}[\rho, \nabla\rho] = \int f(\rho(\vec{r}), \nabla\rho(\vec{r})) d\vec{r} \quad (4.19)$$

f es una función de la densidad electrónica y sus gradientes. Más tarde aparecieron los funcionales meta-GGA que siguen el mismo desarrollo pero tomando en cuenta gradientes de segundo orden.

A principios de los años noventa se desarrollaron los funcionales híbridos. En este tipo de funcionales, se combina la energía de intercambio exacta de Hartree-Fock con aproximaciones a la energía de correlación. Además, se utilizan parámetros empíricos con el fin de reproducir datos experimentales. En este trabajo se empleó el funcional M06 clasificado como un funcional híbrido meta-GGA. A continuación se escribe este funcional en función de la densidad de espín y considerando las variables como se encuentran en el trabajo original publicado por Zhao y Truhlar.¹⁴⁷

II. FUNCIONAL M06

El funcional de intercambio y correlación E_{XC}^{M06} es un funcional híbrido meta-GGA que se caracteriza por tomar en cuenta explícitamente la densidad de espín (ρ_σ), el gradiente de la densidad de espín (x_σ) y la densidad de espín de la energía cinética (τ_σ). El gradiente de la densidad de espín (x_σ) se define como:

$$x_\sigma = \frac{|\nabla\rho_\sigma|}{\rho_\sigma^{4/3}} \quad \sigma = \alpha, \beta \quad (4.20)$$

y la densidad de espín de la energía cinética (τ_σ) como:

$$\tau_\sigma = \frac{1}{2} \sum_i^{oc} |\nabla\Psi_{i\sigma}|^2 \quad (4.21)$$

El funcional M06 incluye dos funciones de trabajo ($h_X(x_\sigma, z_\sigma)$ y $Y(x_\sigma, z_\sigma)$) y una variable de trabajo (z_σ), que se presentan a continuación:

$$h_X(x_\sigma, z_\sigma) = \frac{d_0}{Y(x_\sigma, z_\sigma)} + \frac{d_1 x_\sigma^2 + d_2 z_\sigma}{Y_\sigma^2(x_\sigma, z_\sigma)} + \frac{d_3 x_\sigma^4 + d_4 x_\sigma^5 z_\sigma + d_5 z_\sigma^2}{Y_\sigma^3(x_\sigma, z_\sigma)} \quad (4.22)$$

$$Y(x_\sigma, z_\sigma) = 1 + \alpha(x_\sigma^2 + z_\sigma) \quad (4.23)$$

Donde z_σ y C_F se definen como:

$$z_\sigma = \frac{2\tau_\sigma}{\rho_\sigma^{5/3}} - C_F \quad (4.24)$$

$$C_F = \frac{3}{5}(6\pi^2)^{2/3} \quad (4.25)$$

Este funcional tiene 27% de intercambio exacto de Hartree-Fock y se encuentra parametrizado para interacciones no covalentes, y metales de transición.

$$E_{XC}^{M06} = 0.27E_X^{HF} + 0.73E_X^{M06} + E_C^{M06} \quad (4.26)$$

La fracción de intercambio local de este funcional está dada en términos de la densidad de la energía de intercambio de PBE, ($F_{X\alpha}^{PBE}(\rho_\sigma, \nabla\rho_\sigma)$), del intercambio $\varepsilon_{X\sigma}^{LSDA}$, de la función de trabajo ($h_X(x_\sigma, z_\sigma)$) y un factor de ajuste para la densidad de espín de la energía cinética, ($f(\omega_\sigma)$).

$$E_X^{M06} = \sum_\sigma \int dr [F_{X\alpha}^{PBE}(\rho_\sigma, \nabla\rho_\sigma)f(\omega_\sigma) + \varepsilon_{X\sigma}^{LSDA} h_X(x_\sigma, z_\sigma)] \quad (4.27)$$

El intercambio $\varepsilon_{X\sigma}^{LSDA}$ está definido como:

$$\varepsilon_{X\sigma}^{LSDA} = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} \rho_\sigma^{4/3} \quad (4.28)$$

El factor de ajuste para la densidad de espín de la energía cinética, ($f(\omega_\sigma)$) se define como:

$$f(\omega_\sigma) = a_i \omega_\sigma^i \quad (4.29)$$

Donde a_i es un parámetro empírico de ajuste y ω_σ es una función de t_σ , que a su vez es función de la densidad de espín de la energía cinética (τ_σ) y de la densidad de espín (ρ_σ). Estas variables se definen a continuación:

$$\omega_\sigma = \frac{t_\sigma - 1}{t_\sigma + 1} \quad (4.30)$$

$$t_\sigma = \frac{\tau_\sigma^{LSDA}}{\tau_\sigma} \quad (4.31)$$

Finalmente

$$\tau_\sigma^{LSDA} \equiv \frac{3}{10} (6\pi^2)^{2/3} \rho_\sigma^{5/3} \quad (4.32)$$

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

$$E_C = E_C^{\alpha\beta} + E_C^{\sigma\sigma} + E_C^{\beta\beta} \quad (4.33)$$

Para la alineación paralela la correlación está definida como:

$$E_C^{\sigma\sigma} = \int e_{\sigma\sigma}^{UEG} [g_{\sigma\sigma}(x_\sigma) + h_{\sigma\sigma}(x_\sigma, z_\sigma)] D_\sigma dr \quad (4.34)$$

Mientras que para la alineación antiparalela, la correlación es expresada de la siguiente forma:

$$E_C^{\alpha\beta} = \int e_{\alpha\beta}^{UEG} [g_{\alpha\beta}(x_\alpha, x_\beta) + h_{\alpha\beta}(x_{\alpha\beta}, z_{\alpha\beta})] dr \quad (4.35)$$

En estas ecuaciones, $e_{\sigma\sigma}^{UEG}$ y $e_{\alpha\beta}^{UEG}$ representan la densidad de la energía de correlación para el sistema gas homogéneo de electrones tomando en cuenta las alineaciones de espín

paralela y antiparalela, respectivamente. El parámetro D_σ , presente únicamente para la expresión de la energía de correlación para la alineación paralela es el factor de corrección para la auto-interacción electrónica y se define como:

$$D_\sigma = 1 - \frac{x_\sigma^2}{4(z_\sigma + C_F)} \quad (4.36)$$

Los términos $g_{\sigma\sigma}(x_\sigma)$ y $g_{\alpha\beta}(x_\alpha, x_\beta)$ se definen como:

$$g_{\sigma\sigma}(x_\sigma) = \sum_{i=0}^n c_{C\sigma\sigma,i} \left(\frac{0.06x_\sigma^2}{1 + 0.06x_\sigma^2} \right)^i \quad (4.37)$$

$$g_{\sigma\sigma}(x_\sigma) = \sum_{i=0}^n c_{C\sigma\beta,i} \left(\frac{0.0031(x_\alpha^2 + x_\beta^2)}{1 + 0.0031(x_\alpha^2 + x_\beta^2)} \right)^i \quad (4.38)$$

III. PSEUDOPOTENCIAL Y BASES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

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

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = R_{n,l}(r)Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (4.39)$$

Donde el término $R_{n,l}(r)$ corresponde a la parte radial y $Y_{l,m}(\theta, \phi)$ a la parte angular expresada en función de los armónicos esféricos. Los dos tipos de funciones más utilizadas para obtener la parte radial son las funciones tipo Slater y las funciones Gaussianas. Estos dos tipos de funciones difieren en la forma de expresar la parte radial de la función de onda. Para las funciones tipo Slater se tiene

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = Nr^{n-1}e^{-\zeta r}Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (4.40)$$

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

$$\chi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = Nr^{n-1}e^{-\zeta r^2}Y_{l,m}(\theta, \phi) \quad (4.41)$$

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

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

- BASE 6-31+G(d)

La base utilizada para llevar a cabo los cálculos en este trabajo es la base 6-31+G(d). Esta base utiliza una función contraída, combinación lineal de seis funciones primitivas Gaussianas para describir la capa interna, mientras que la capa de valencia utiliza dos funciones, una interna formada por la combinación lineal de tres funciones primitivas y otra externa descrita por una función primitiva. La base 6-31+G(d) cuenta con polarización, lo que quiere decir que se le adicionaron orbitales con mayor momento angular respecto al requerido para el estado basal de cada átomo. De esta forma los orbitales d pueden añadir polarización a los orbitales p . Además, es una base con funciones difusas que sirven para mejorar la descripción de los electrones más alejados del núcleo. Estas bases se construyen añadiendo a cada átomo un conjunto de funciones con coeficientes orbitales muy pequeños (s, p_x, p_y, p_z) que sirven para que los orbitales ocupen un espacio mayor y así se describan mejor las regiones más alejadas de los centros nucleares.

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

Con la base 6-311+G(d,p) se llevaron a cabo los cálculos de punto simple de las geometrías optimizadas para refinar aspectos electrónicos en los sistemas estudiados. Al igual que la base 6-31+G(d), esta base es de valencia desdoblada, donde se añadieron un par de términos. Se aumentó el número de funciones utilizadas para describir la capa de valencia. La base 6-311+G(d,p) cuenta con una función externa adicional descrita por una función primitiva, y se le añadió también a cada átomo de hidrógeno un conjunto de orbitales $2p$ para describir con mayor precisión las especies aniónicas.

- PSEUDOPOTENCIAL LANL2DZ

Los pseudopotenciales se utilizan generalmente para la descripción de átomos pesados, elementos a partir del cuarto periodo de la Tabla Periódica, y se caracterizan por separar la descripción electrónica de los átomos en dos partes. Se consideran los electrones internos y el núcleo como una unidad con una carga específica y los electrones de valencia se tratan por separado. La utilización de pseudopotenciales hace más eficientes los cálculos computacionales, ya que se reduce el tamaño de las funciones base y permite un tratamiento adecuado de los efectos relativistas.

En este trabajo se utilizó el pseudopotencial LanL2DZ desarrollado por Hay y Wadt en el Laboratorio Nacional de Los Álamos.¹⁴⁸ Este pseudopotencial ha sido ampliamente utilizado en química cuántica, particularmente en el estudio de compuestos o cúmulos que contienen elementos pesados ($Z > 38$). El pseudopotencial LanL2DZ es comúnmente empleado en cálculos de Teoría de Funcionales de la Densidad, donde predice correctamente los estados atómicos para metales de transición, debido a que se ajusta para elementos después del tercer periodo ($n > 3$) y con orbitales de valencia nd , $(n+1)s$ y $(n+1)p$. Este pseudopotencial toma 19 electrones de valencia para describir los átomos del grupo 11 (Cu, Ag y Au).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó en los “Antecedentes”, la silibina (Figura 5.1) es el componente principal de la silimarina;¹⁰⁰ una mezcla de flavonoides, que a su vez es la sustancia activa del cardo mariano,^{100,110} una planta con reconocidas propiedades benéficas.^{51-67,93,118}

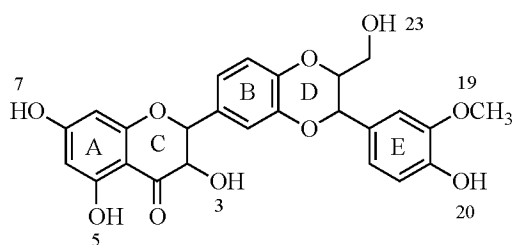


Figura 5.1. Estructura molecular de la SIL con la numeración basada en la IUPAC.

Aunque el estudio de la silibina (SIL) ha sido en general extenso, poco se sabe sobre la capacidad antioxidante de los demás componentes principales de la silimarina. Tampoco hay muchas investigaciones relacionadas con los cambios en la reactividad de la SIL interaccionando con átomos y cúmulos metálicos, especialmente desde el punto de vista teórico.

La SIL no es el único compuesto que contiene la silimarina. Existen otros componentes principales que también son flavonoides entre los que destacan la silicristina (SILIC), la silidianina (SILID), la isosilibina (ISOSIL) y la taxifolina (TAX). En la Figura 5.2 se presentan sus fórmulas estructurales. El porcentaje de cada componente presente en la mezcla se reporta en la misma figura, y con una estrella (*) se indica el protón más ácido para futuras referencias. Cabe destacar que con excepción de la TAX, todos los demás componentes principales son isómeros estructurales. La mezcla de silimarina contiene además un porcentaje significativo de compuestos no identificados (10%-30%).

Los estudios sobre la capacidad antioxidante sólo están reportados para SIL y su especie desprotonada. Sin embargo, no hay investigaciones que analicen los demás componentes principales antes citados. Los resultados experimentales y teóricos para SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ indican que los mecanismos principales para atrapar radicales libres son la transferencia electrónica (SET), la formación del aducto radical (RAF) y la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT).^{93,98,121} La silimarina es una mezcla compleja de flavonoides, que combinados tienen una potente capacidad antioxidante. Los resultados experimentales muestran que la capacidad para atrapar radicales libres de la SIL, el principal componente de la mezcla, es buena, pero esto no significa que sea el único compuesto de la mezcla con estas características. Con el fin de detectar cuál es el mejor antioxidante de los compuestos que conforman la mezcla de la silimarina, se investigó la capacidad antioxidante de estos compuestos. Con base en esta idea, en este trabajo se estudió la capacidad antioxidante de SILIC, ISOSIL, SILID y TAX, y se compararon los resultados con los obtenidos para SIL. Se incluyen las especies desprotonadas de los componentes principales de la silimarina ($[\text{SILIC}_{(-\text{H})}]^{-1}$, $[\text{ISOSIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, $[\text{SILID}_{(-\text{H})}]^{-1}$ y $[\text{TAX}_{(-\text{H})}]^{-1}$) ya que están presentes a pH fisiológico.

Uno de los intereses de este trabajo es analizar los cambios de reactividad de la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ cuando interaccionan con átomos y cúmulos metálicos. Esta idea nace de trabajos previos, donde se ha reportado que la interacción de sustratos metálicos con moléculas orgánicas produce un aumento en las propiedades ópticas, eléctricas y espectroscópicas.¹⁴⁹⁻¹⁵³ Se piensa que estos nuevos sistemas pueden servir como biosensores y materiales antioxidantes. Además, la presencia de átomos y cúmulos metálicos interaccionando con moléculas orgánicas aumenta la intensidad de las señales de los espectros Raman, lo que permite su detección a menores concentraciones. A esto se le conoce como el efecto SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering* por sus siglas en inglés), y ha resultado ser muy útil sobre todo para la detección de concentraciones traza.^{154,155} Los metales que más se utilizan para el SERS son Cu, Ag y Au.¹⁵⁵

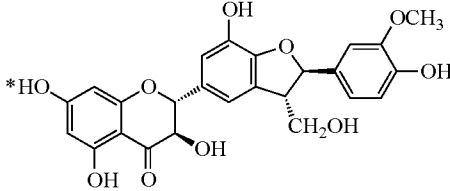
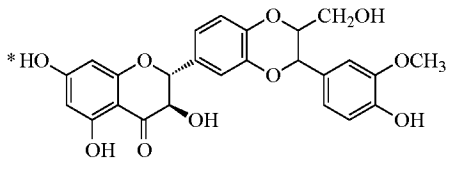
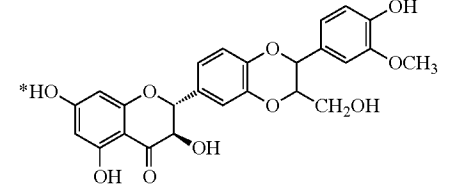
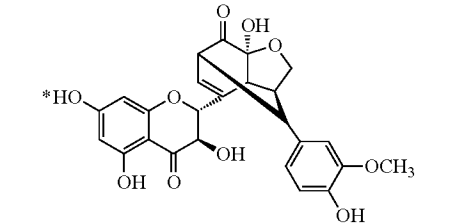
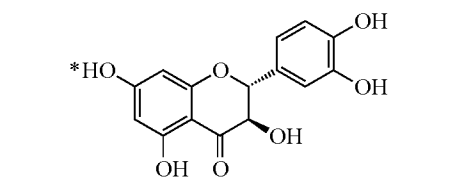
<p>Silicristina (SILIC) 27.9%</p>	
<p>Silibina (SIL) 50.6 %</p>	
<p>Isosilibina (ISOSIL) 10.5 %</p>	
<p>Silidianina (SILID) 2.9 %</p>	
<p>Taxifolin (TAX) 4.1 %</p>	

Figura 5.2. Fórmulas estructurales de los componentes principales de la silimarina. Se reporta la abundancia relativa (en porcentaje) (Aldrich MDL/MFCD01776359) y se indica con una estrella (*) el protón más ácido de cada molécula.

Las propiedades antioxidantes de las moléculas cambian cuando se enlazan a metales de transición.^{96,156} Esto se reconoce en estudios teóricos previos donde se analizó la interacción de astaxantina con metales como Cu y Cd.⁹⁶ Para la SIL se han reportado resultados experimentales sobre los cambios en la reactividad debidos a la presencia de Cu(II), en particular cambios en las propiedades pro-oxidantes.^{121,157,158} La capacidad antioxidante de la SIL interaccionando con átomos y cúmulos metálicos no se ha investigado desde el punto de vista teórico, por lo que resulta interesante analizar cómo la presencia de átomos y cúmulos metálicos modifican la reactividad y la capacidad

antioxidante de la SIL. En este trabajo, la capacidad antioxidante de estos nuevos sistemas se estudia mediante los mecanismos SET, RAF y HAT para establecer cuál es el más favorecido. Además, para los productos más estables de los mecanismos RAF y HAT, se investiga la transferencia de electrones. Esto con el fin de analizar si los aductos radicales y los sistemas deshidrogenados tienen la capacidad para donar y aceptar un electrón, y con eso seguir atrapando radicales libres. Esto implicaría la posibilidad de una nueva cascada antioxidante. Primero, los antioxidantes pueden reaccionar a través del mecanismo RAF y HAT; y los productos formados estabilizar radicales libres mediante el mecanismo SET.

I. DETALLES COMPUTACIONALES

Este estudio se llevó a cabo con el código Gaussian09 y la interfaz gráfica Gaussview5.¹⁵⁹ Todos los cálculos fueron efectuados utilizando la aproximación a la Teoría de Funcionales de la Densidad con el funcional M06. Para todas las estructuras optimizadas se analizaron las frecuencias vibracionales, verificando que no hubiera ninguna frecuencia imaginaria, y así asegurar que las geometrías obtenidas fueran un mínimo en la superficie de energía potencial.

Para el estudio de los componentes principales de la silimarina se empleó el nivel de teoría M06/6-31+G(d) en fase gas. La base 6-31+G(d) es de tipo Gaussiana doble zeta con polarización y funciones difusas.^{147,160-163} Esta metodología se ha utilizado anteriormente y describe con precisión este tipo de sistemas.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Para obtener los diferentes pKa de las moléculas se utilizó el software Marvin Sketch, un algoritmo que identifica los grupos funcionales de las moléculas y los asocia a una librería de valores de pKa de moléculas conocidas.¹⁶⁷

En el estudio de la interacción de átomos y cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au con SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ se empleó el funcional M06 y el pseudopotencial de Los Álamos LanL2DZ en fase gas.¹⁴⁸ La multiplicidad utilizada fue singulete o doblete y se estudiaron los cúmulos neutros y cargados. También se obtuvieron los espectros Raman.

La capacidad antioxidante de todos los sistemas se investigó con base en los tres mecanismos principales:

- transferencia electrónica (SET)
- formación del aducto radical (RAF)
- transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

El mecanismo de transferencia electrónica (SET) se estudió a través de las energías de ionización y las afinidades electrónicas verticales, debido a que se espera que la transferencia de un electrón no va a modificar significativamente la estructura de las moléculas. Como son verticales, se calculó la energía en un solo punto utilizando la geometría optimizada del sistema neutro y del anión en el caso de las moléculas desprotonadas, o del catión en el caso de los sistemas con átomos y cúmulos cargados.

El mecanismo SET se estudió en dos sentidos, la capacidad de las moléculas para donar un electrón y la capacidad para aceptarlo. Se utilizó el FEDAM (*Full Electron Donor Acceptor Map*, por sus siglas en inglés) que es una gráfica que permite obtener información comparativa de la capacidad de los sistemas para donar y aceptar electrones (Figura 5.3).^{38,90} En este mapa se grafica en el eje de las ordenadas la energía de ionización (I) y en el eje de las abscisas la afinidad electrónica (A) de los sistemas. Las sustancias se clasifican por comparación, de acuerdo con la capacidad que tienen para donar y aceptar electrones. Un sistema ubicado abajo a la izquierda será un buen donador de electrones, mientras que uno que se encuentre arriba a la derecha será un buen aceptor de electrones. Las especies que se sitúen en estas dos regiones del mapa serán buenos donadores y aceptores de electrones respectivamente. La transferencia de electrón se lleva a cabo desde las moléculas situadas en la región de buenos donadores hacia las moléculas en la región de buenos aceptores.

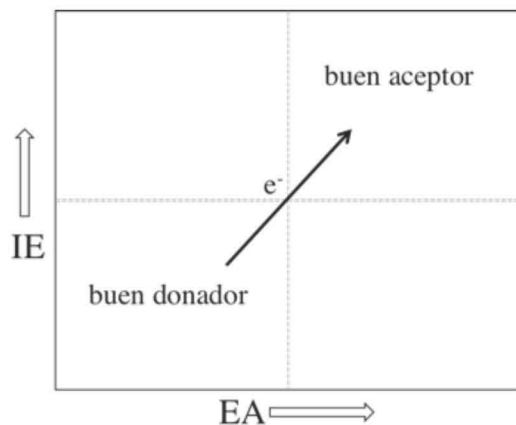
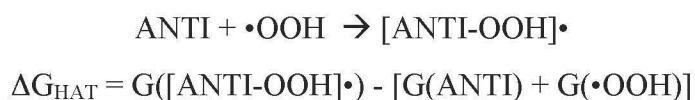


Figura 5.3. FEDAM (*Full electron donor-acceptor map*).

En el estudio de los componentes principales de la silimarina se utilizó la base 6-311+G(d,p) que añade polarización para tratar con mayor precisión a los aniones. Se consideraron los efectos del disolvente en distintos medios: polar (agua) y no polar (DMSO).¹⁶⁸

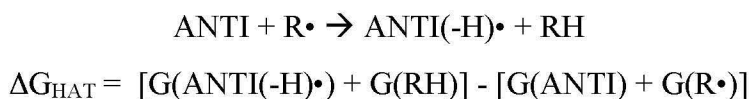
Para el estudio de la interacción de la SIL con átomos y cúmulos metálicos se utilizó el mismo nivel de teoría pero se consideraron los efectos del disolvente con el modelo de solvatación SMD y con agua como medio polar. Por último, para los sistemas más estables de los mecanismos RAF y HAT, se analizó la capacidad para donar y aceptar un electrón mejorando el nivel de teoría M06/6-31+G(d,p)/LanL2DZ.

El mecanismo de formación del aducto radical (RAF) se estudió de acuerdo con la siguiente reacción de disociación:



[ANTI-OOH]• es el aducto radical.

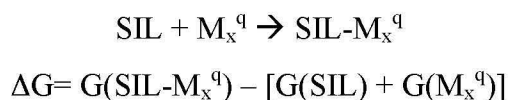
El mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) se estudió mediante el siguiente esquema de reacción:



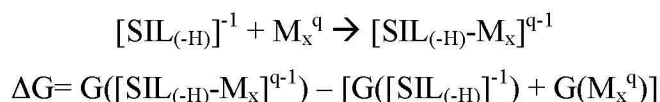
ANTI representa los antioxidantes, ANTI(-H) son los sistemas deshidrogenados, R• los radicales libres y RH corresponde a sus formas estabilizadas. (R•= •OH, •OOH, NO₂• y CH₃O• y C₆H₅O•; y RH=H₂O, H₂O₂, HNO₂, CH₃OH y C₆H₅OH, respectivamente).

Para estudiar la interacción entre los átomos y cúmulos metálicos con las moléculas SIL y [SIL_(-H)]⁻¹, se obtuvieron las energías libres de Gibbs a 298 K siguiendo los siguientes esquemas de reacción:

Para SIL:



Para [SIL_(-H)]⁻¹:



M corresponde a Cu, Ag y Au según sea el caso, *x* es el número de átomos metálicos (1 ó 4) y *q* que corresponde a la carga total del sistema (0 ó 1).

Para llevar a cabo el estudio del cambio en la reactividad de la SIL y la [SIL_(-H)]⁻¹ con los tetrámeros de Cu, Ag y Au se analizaron los mecanismos de formación del aducto radical y de transferencia de átomo de hidrógeno. Se estudiaron los sistemas formados con cúmulos neutros y cargados positivamente. Para [SIL_(-H)]⁻¹ interaccionando con M₄ se produce el aducto radical con carga negativa ([SIL_(-H)-M₄-OOH]^{-1•}) mientras que para la [SIL_(-H)]⁻¹ interaccionando con [M₄]⁺, el aducto radical que se forma es neutro ([SIL_(-H)-M₄-OOH]). Se siguieron los siguientes esquemas de reacción.

Para SIL:

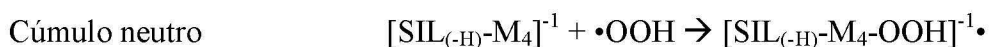


$$\Delta G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]\bullet) - G(\text{SIL-M}_4) - G(\bullet\text{OOH})$$

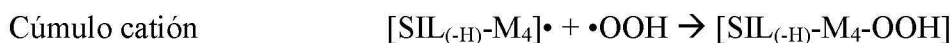


$$\Delta G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^+) - G([\text{SIL-M}_4]\bullet^+) - G(\bullet\text{OOH})$$

Para $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$:



$$\Delta G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{-1}\bullet) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}) - G(\bullet\text{OOH})$$



$$\Delta G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]\bullet) - G(\bullet\text{OOH})$$

SIL-M_4 , $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]$, $[\text{SIL-M}_4]\bullet^+$ y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]\bullet$ corresponden a los sistemas de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ interaccionando con los tetrámeros de Cu, Ag y Au como sistemas neutros y cargados positivamente.

El mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno se investigó considerando las reacciones que se representan a continuación:



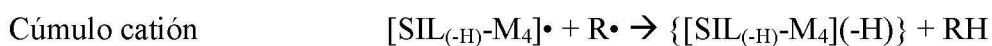
$$\Delta G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL-M}_4](-\text{H})\}\bullet) + G(\text{RH}) - G(\text{SIL-M}_4) - G(\bullet\text{R})$$



$$\Delta G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL-M}_4](-\text{H})\}^+) + G(\text{RH}) - G([\text{SIL-M}_4]\bullet^+) - G(\bullet\text{R})$$



$$\Delta G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4](-\text{H})\}^{-1}\bullet) + G(\text{RH}) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}) - G(\bullet\text{R})$$



$$\Delta G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4](-\text{H})\}) + G(\text{RH}) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]\bullet) - G(\bullet\text{R})$$

SIL-M₄, [SIL_(-H)-M₄]⁻¹, [SIL-M₄]^{•+} y [SIL_(-H)-M₄][•] corresponden a los sistemas de estudio, [•]R es un radical libre ([•]OH, [•]OOH, NO₂[•] y C₆H₅O[•]) mientras que RH representa el radical libre enlazado a un átomo de hidrógeno (RH=H₂O, H₂O₂, HNO₂ y C₆H₅OH,). Las especies {[SIL-M₄]_(-H)][•], {[SIL-M₄]_(-H)}⁺, {[SIL_(-H)-M₄]_(-H)}⁻¹[•] y {[SIL_(-H)-M₄]_(-H)} son las especies de los sistemas deshidrogenados.

II. COMPONENTES PRINCIPALES DE LA SILIMARINA

En las Figura 5.4 y 5.5 se muestran las fórmulas estructurales y las geometrías optimizadas de los componentes principales de la silimarina y de sus respectivas especies desprotonadas. En todos los casos se reportan los puentes de hidrógeno intramoleculares.^{98,121} Todas las moléculas presentan tres puentes de hidrógeno intramoleculares, dos de ellos correspondientes a la estructura tipo flavonoide entre los grupos -OH y el CO. A estos puentes de hidrógeno corresponden las distancias de enlace más cortas, lo que coincide con lo reportado previamente.¹²¹

En la Figura 5.4, se reporta la diferencia de energías entre las estructuras. La más estable es SILIC y la menos, SILID. La diferencia entre ambas es de 5.41 kcal/mol. Esta diferencia de energía está dentro del rango de error de la metodología, por lo que no se puede discriminar entre ellas y se espera que coexistan en condiciones experimentales.

En la Figura 5.5, se reporta las estabilidad relativa de los compuestos desprotonados. Para todas las moléculas, el protón más ácido se sitúa en la posición R₇ en el anillo A,^{93,98,121} indicado en la Figura 5.2 con una estrella. El componente [SILIC_(-H)]⁻¹ es el más estable, mientras que las moléculas [ISOSIL_(-H)]⁻¹, [SILID_(-H)]⁻¹ y [SIL_(-H)]⁻¹ son 3.7, 5.6 y 6.5 kcal/mol menos estables, respectivamente. Estas diferencias de energías también están dentro del rango de error, por lo que todos los compuestos podrían coexistir en condiciones experimentales.

El único compuesto que no es un isómero estructural es TAX, que también se incluye en la Figuras 5.4 y 5.5.

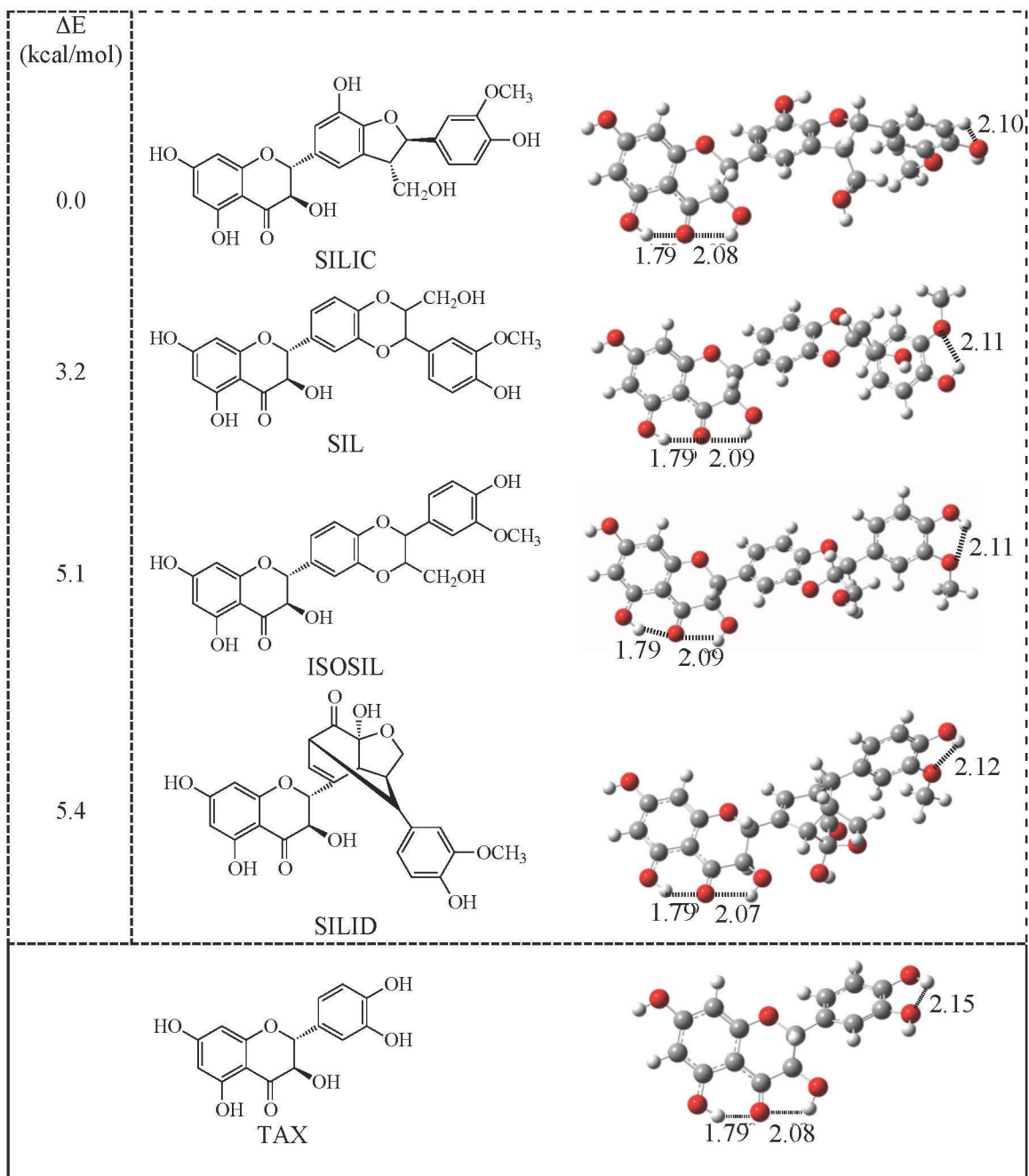


Figura 5.4. Fórmulas estructurales y geometrías optimizadas de los componentes principales de la silimarina. Se reportan las distancias de los puentes de hidrógeno intramoleculares y las diferencias de energías relativas (ΔE en kcal/mol) para los isómeros estructurales.

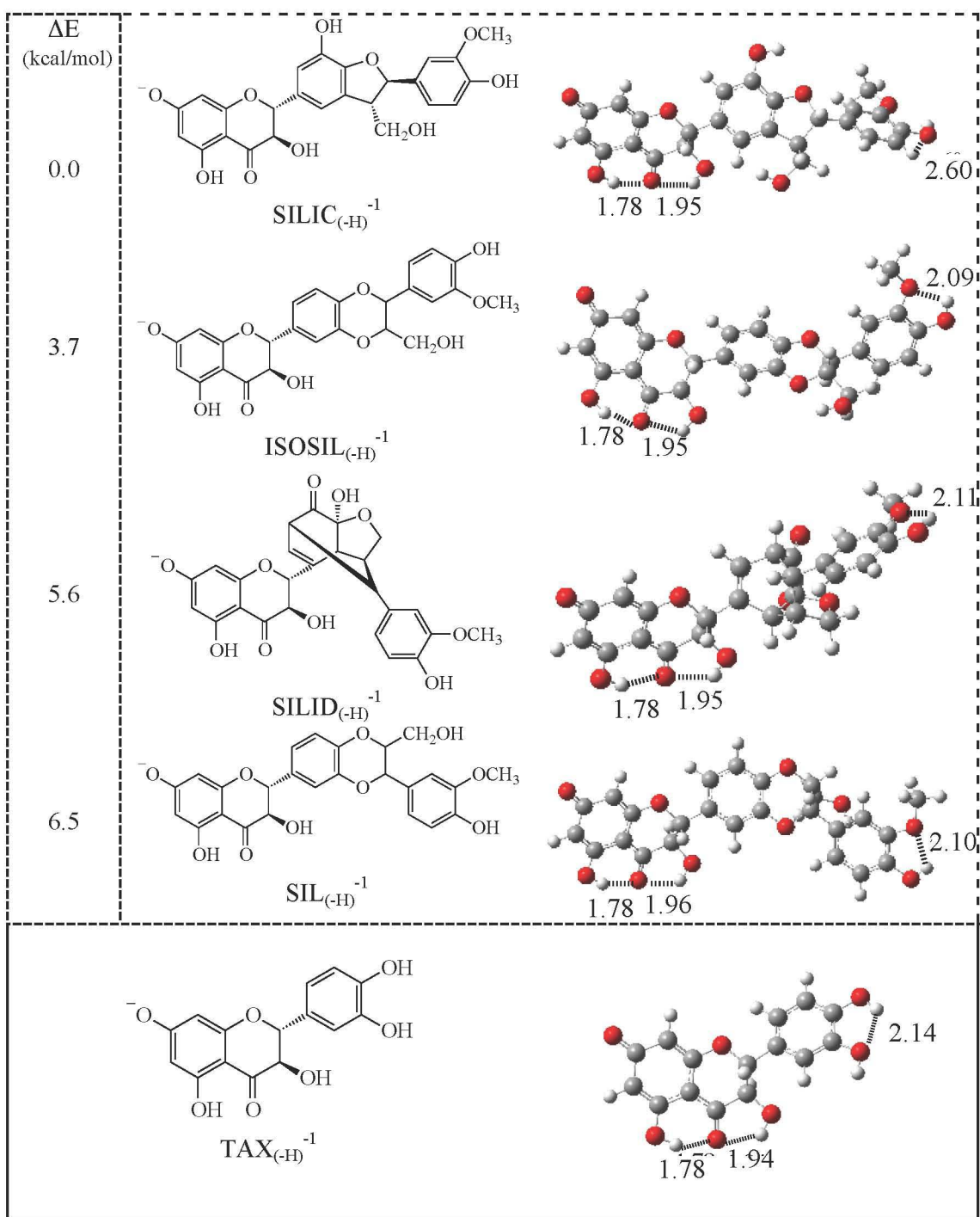


Figura 5.5. Fórmulas estructurales y geometrías optimizadas de los componentes principales de la silimarina como sistemas desprotonados. Se reportan las distancias de los puentes de hidrógeno intramoleculares y las diferencias de energías relativas al más estable (ΔE en kcal/mol) para los isómeros estructurales.

En las Figuras 5.6 y 5.7 se presentan los FEDAM para los sistemas estudiados considerando H₂O y DMSO como disolventes, respectivamente. Se incluyen otras moléculas antioxidantes (astaxantina (ASTA) y resveratrol (RESVE)), el radical libre DPPH•, y las moléculas SIL, [SIL_(-H)]⁻¹ y 2,3-DEHI, y [2,3-DEHI_(-H)]⁻¹ ya reportadas para poderlas comparar.

En la Figura 5.6 se observa que los compuestos estudiados (ANTI) tienen energías de ionización y afinidades electrónicas similares. Lo mismo sucede con los componentes desprotonados (ANTI_(-H)⁻¹). Si se comparan los especies protonadas con sus respectivas desprotonadas, se observa que las primeras (ANTI) tienen mayor afinidad electrónica que las segundas (ANTI_(-H)⁻¹) y por lo tanto son mejores aceptoras de electrones. Sin embargo, los valores de energía de ionización para moléculas protonadas y desprotonadas son parecidos. Con base en su posición en el mapa, ninguna de estas moléculas es capaz de donar o aceptar un electrón del DPPH•, por lo que no pueden atraparlo. Los sistemas que pueden donar un electrón al DPPH• y así estabilizarlo son ASTA y 2,3-DEHI_(-H)⁻¹. Resultados similares se observan en las moléculas reportadas en la Figura 5.7, con la excepción de SIL_(-H)⁻¹ que tiene una energía de ionización menor que los demás ANTI_(-H)⁻¹ y podría donarle un electrón al DPPH•.

La mejor molécula antioxidante para este mecanismo de transferencia electrónica es ASTA pues presenta el valor más bajo de *I* y el más alto de *A*.

Con los valores de las figuras anteriores se puede decir que ninguno de los componentes principales de la silimarina destaca especialmente con respecto a los otros, pues presentan energías de ionización y afinidades electrónicas similares. Salvo SIL_(-H)⁻¹ en un medio no polar, ninguna es capaz de atrapar el radical libre DPPH• por lo que probablemente la transferencia de un electrón no sea el mecanismo antioxidante principal.

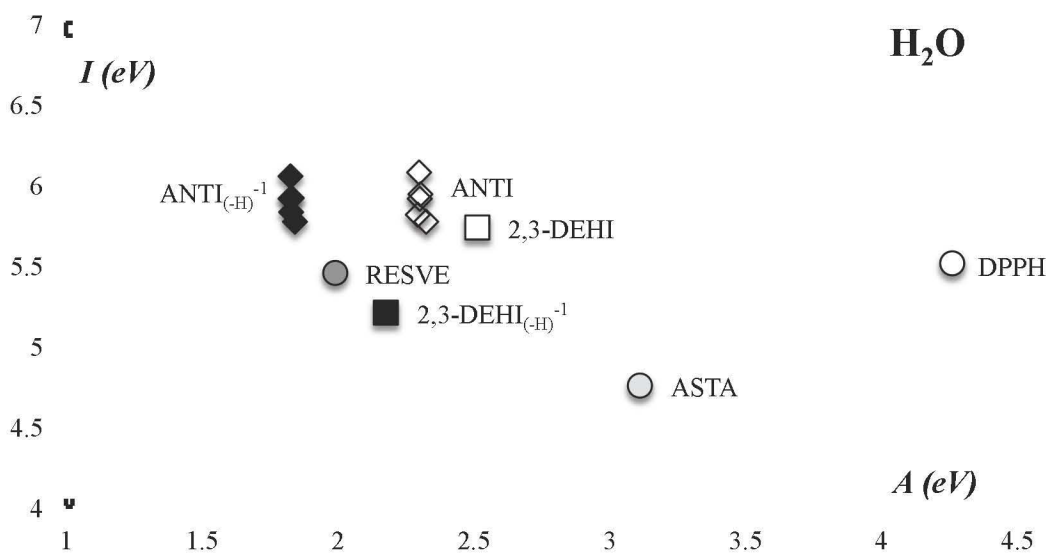


Figura 5.6. FEDAM para los componentes principales de la silimarina neutros (ANTI) y desprotonados (ANTI_(-H)⁻¹). Los compuestos DPPH, ASTA, RESVE (resveratrol), 2-3 DEHI (2,3-dehidrosilibina) y 2,3-DEHI_(-H)⁻¹ (2,3-dehidrosilibina desprotonada) se incluyen para poder compararlos. Los resultados de esta gráfica fueron obtenidos con agua como disolvente.

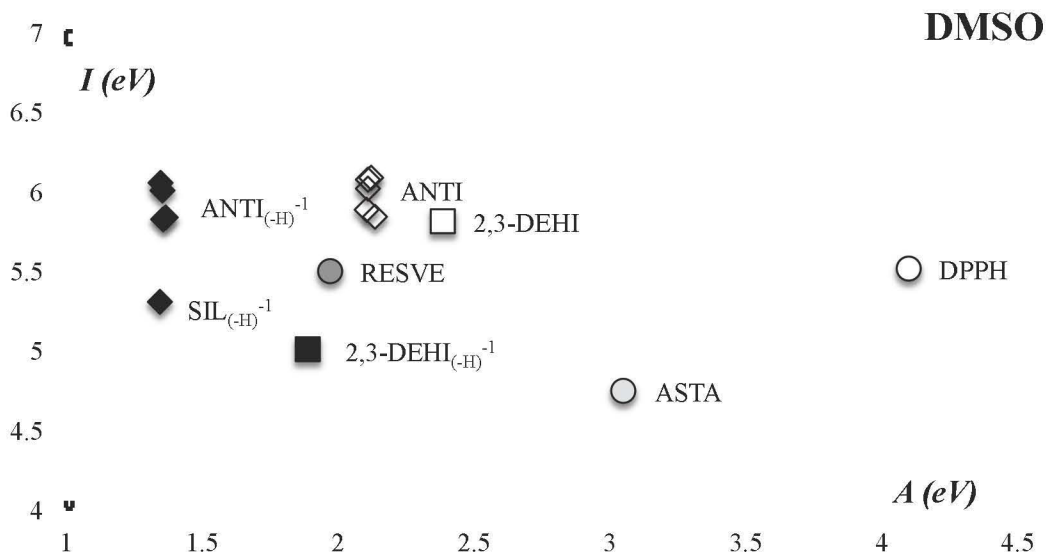


Figura 5.7. FEDAM para los compuestos principales de la silimarina neutros (ANTI) y desprotonados (ANTI_(-H)⁻¹). Los compuestos DPPH, ASTA, RESVE (resveratrol), 2-3 DEHI (2,3-dehidrosilibina) y 2,3-DEHI_(-H)⁻¹ (2,3-dehidrosilibina desprotonada) se incluyen para compararlos. Los resultados de esta gráfica fueron obtenidos con DMSO como disolvente.

Para analizar la formación del aducto radical (RAF) como mecanismo para atrapar radicales libres, en las Figuras 5.8 y 5.9 se presentan las estructuras optimizadas [ANTI-OOH]•. En las estructuras más estables se observa que se forman puentes de hidrógeno intermoleculares.

La reacción de formación del aducto radical se analiza a través de la diferencia de energías libres de Gibbs entre los reactivos y productos de la reacción (ΔG en kcal/mol). Valores negativos de ΔG indican que la formación de los sistemas es un proceso favorecido termodinámicamente y por lo tanto el aducto es más estable que las moléculas ANTI y el radical libre •OOH por separado. Los valores de las Figuras 5.8 y 5.9 indican que todos los sistemas se forman en reacciones favorecidas termodinámicamente. Según los resultados obtenidos, las moléculas desprotonadas son mejores atraparoras del radical libre •OOH que aquellas que no lo están, ya que los valores de ΔG son más negativos. La SIL es el componente principal de la mezcla pero no es la mejor molécula antioxidante de acuerdo con este mecanismo. Los componentes principales de la silimarina podrían actuar eficientemente para atrapar el radical libre •OOH por medio del mecanismo RAF, pero, ninguno de los componentes resulta mejor antioxidante comparado con los demás.

El último mecanismo que vamos a estudiar para atrapar radicales libres es el HAT. En la Tabla 5.1 se reportan los resultados para este mecanismo. Se quitaron uno a uno todos los átomos de H y sólo se reportan los tres productos deshidrogenados más estables. Se analizaron cinco radicales libres (•OH, •OOH, NO₂•, CH₃O• y C₆H₅O•) para observar si podían existir diferencias significativas entre las distintas moléculas analizadas. Se reporta el ΔG_{HAT} siguiendo la ecuación que se presentó en los detalles computacionales. Los valores negativos indican que la estabilización del radical libre está termodinámicamente favorecida.

Los resultados de la Tabla 5.1 indican que todas las moléculas son capaces de atrapar el radical libre •OH, ya que muestran valores negativos de ΔG_{HAT} lo que indica que la formación de H₂O se encuentra favorecida. De igual forma, todos los componentes mayoritarios de la silimarina atrapan el radical libre •OOH, aunque los valores de ΔG_{HAT}

son más pequeños (la reacción sigue siendo exergónica). Al estudiar al radical libre $\text{NO}_2\cdot$ se observa que ninguno de los compuestos es capaz de atraparlo. Todos presentan valores de ΔG_{HAT} positivos o negativos muy pequeños y por lo tanto son situaciones no favorecidas termodinámicamente. El análisis del radical libre $\cdot\text{OCH}_3$ arroja resultados similares a los del estudio del radical $\cdot\text{OH}$ pues todas las moléculas atrapan este radical con valores ΔG_{HAT} negativos. Con el radical $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot$, aunque los valores son pequeños, se observa que la mayoría de los compuestos estudiados reaccionan para estabilizar este radical.

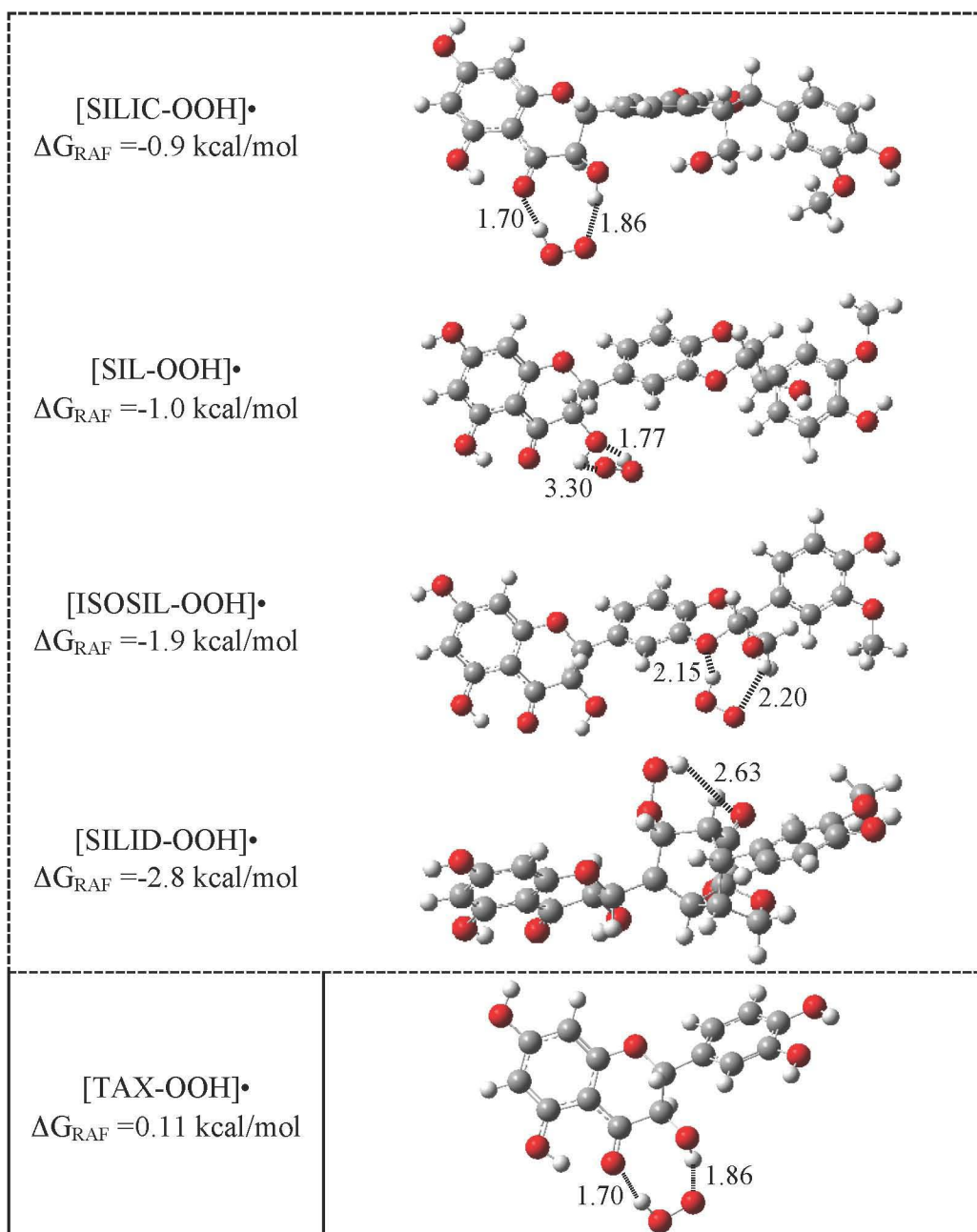


Figura 5.8. Estructuras optimizadas de los diferentes aductos radicales para los componentes principales de la silimarina y ΔG (kcal/mol) para la reacción de formación del aducto.

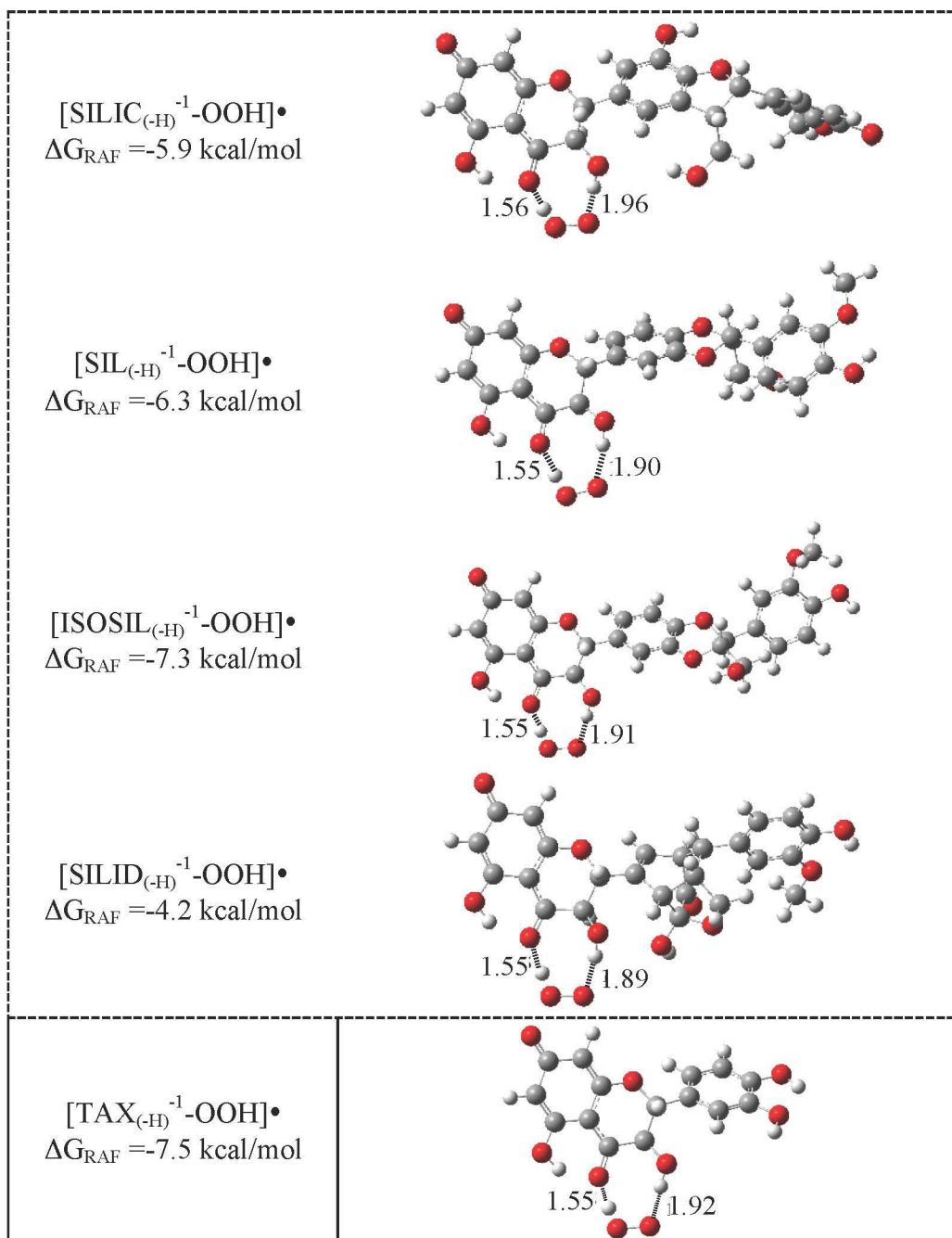
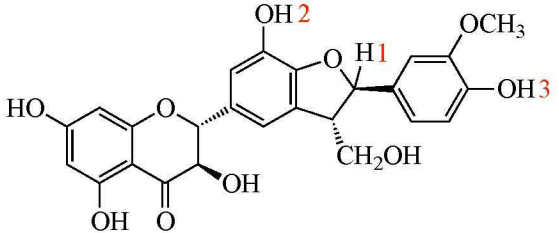
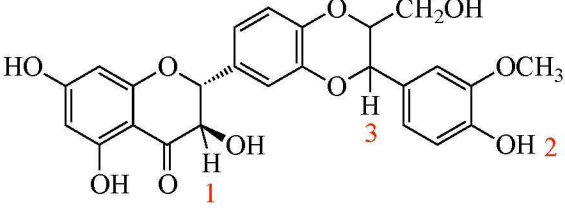
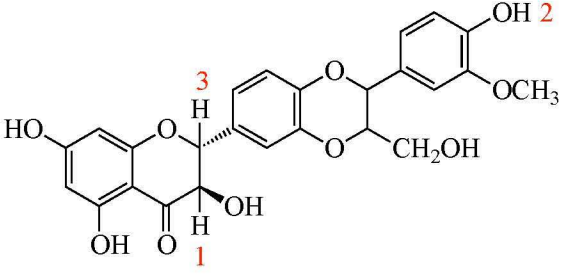
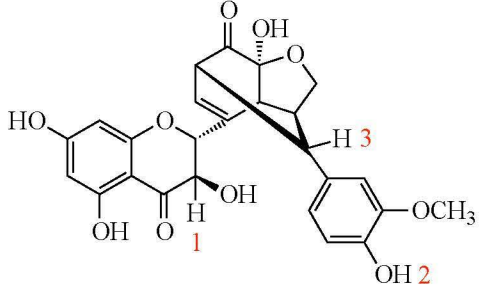
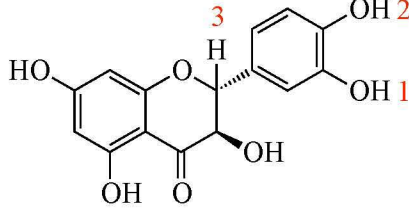
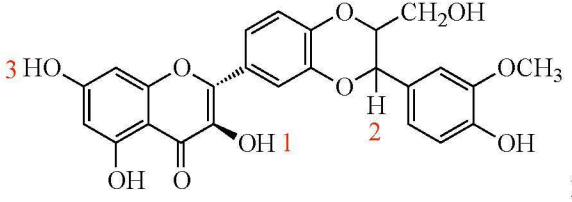


Figura 5.9. Estructuras optimizadas de los diferentes aductos radicales para los componentes principales de la silimarina como sistemas desprotonados y ΔG (kcal/mol) para la reacción de formación del aducto.

Tabla 5.1. Estudio HAT para los componentes principales de la silimarina. En cada caso se presentan las fórmulas estructurales de los componentes y los átomos de H más fáciles de abstraer (1, 2, 3).

Molécula	Posiciones reactivas	ΔG_{HAT} (kcal/mol)				
		$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OOH}$	$\text{NO}_2\bullet$	$\text{CH}_3\text{O}\bullet$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\bullet$
 <p>SILIC</p>	1 2 3	-36.0 -35.5 -34.6	-3.4 -2.9 -2.0	3.4 3.8 4.8	-48.1 -47.6 -46.7	-2.0 -1.5 -0.6
 <p>SIL</p>	1 2 3	-36.5 -34.5 -34.2	-3.9 -1.9 -1.6	2.8 4.8 5.2	-48.6 -46.6 -46.2	-2.5 -0.1 -0.5
 <p>ISOSIL</p>	1 2 3	-37.5 -34.2 -30.7	-4.9 -1.6 1.9	1.9 5.2 8.7	-49.5 -46.2 -42.8	-3.4 -0.1 3.4
 <p>SILID</p>	1 2 3	-38.7 -35.1 -34.1	-6.1 -2.5 -1.5	0.7 4.2 5.3	-50.8 -47.2 -46.2	-4.7 -0.04 -1.1
 <p>TAX</p>	1 2 3	-41.8 -33.5 -31.6	-9.2 -0.9 1.0	-2.5 5.9 7.8	-53.9 -45.5 -43.7	-7.8 0.6 2.4
 <p>2,3-DEHI</p>	1 2 3	-35.6 -33.5 -29.8	-3.0 -0.9 2.8	3.8 5.9 9.6	-47.7 -45.5 -41.9	-1.5 0.6 4.2

- CONCLUSIONES

La primera conclusión de este trabajo es que la SIL y su especie desprotonada no son los componentes más estables ni tampoco los que muestran la mayor capacidad antioxidante de entre los cinco componentes principales de la silimarina estudiados (SIL, ISOSIL, SILIC, SILID y TAX) de acuerdo con los mecanismos de reactividad SET, RAF y HAT. La SIL no destaca por su capacidad para atrapar radicales libres con respecto a los demás componentes de la mezcla.

Para los mecanismos de reactividad estudiados, las especies desprotonadas son mejores antioxidantes que sus análogos como especies neutras.

De acuerdo con los resultados obtenidos no hay un componente que destaque por encima de los demás en cuanto a su capacidad para atrapar radicales libres. Esto quiere decir que la mezcla de silimarina es un potente antioxidante por todos los compuestos que hay en ella.^{1*}

^{1*} Los resultados de esta sección se encuentran en el artículo publicado bajo el título *Is silybn the*

III. INTERACCIÓN DE ÁTOMOS Y CÚMULOS METÁLICOS CON SILIBINA

En la Figura 5.10 se reportan las fórmulas estructurales de las geometrías iniciales que se utilizaron para investigar los sistemas formados por SIL interaccionando con átomos y cúmulos metálicos. Los átomos y los cúmulos metálicos se colocaron a un ángulo de 90° por arriba y por debajo de cada anillo aromático, y en las tres posiciones en las que se pueden formar quelatos, esto es, alrededor del grupo carbonilo del anillo C; R_5 -CO, R_3 -CO y en la posición R_{19} - R_{20} .

A partir de las geometrías iniciales de la Figura 5.10, se optimizaron todos los sistemas con átomos y cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au con SIL como sistemas neutros y cargados. Se compararon las energías totales y se seleccionaron únicamente las estructuras optimizadas más estables.

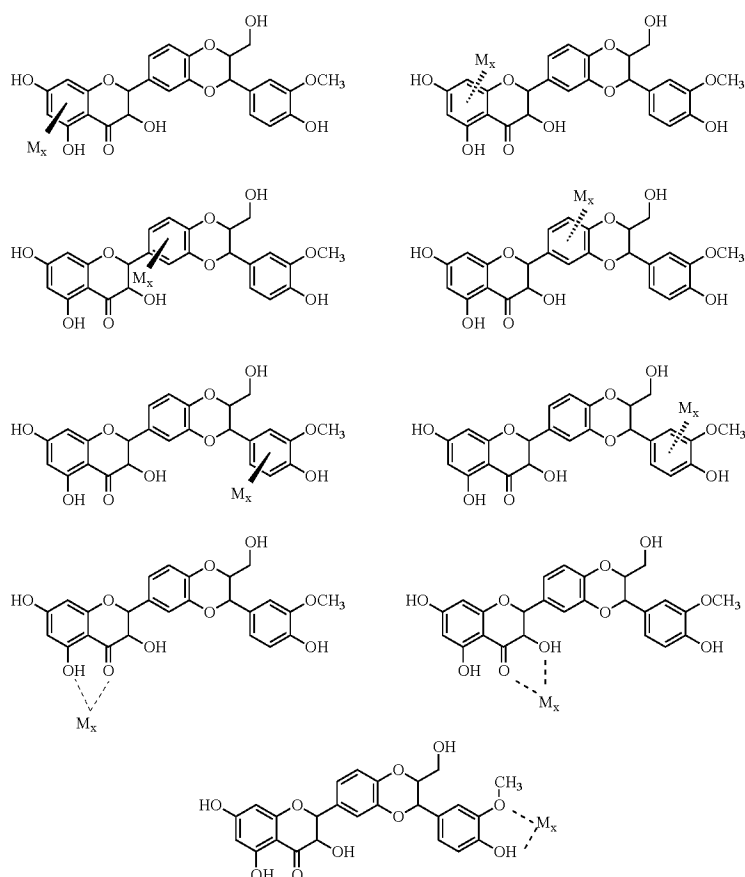


Figura 5.10. Fórmulas estructurales de las geometrías iniciales para SIL interaccionando con átomos y cúmulos metálicos (sistemas neutros y catiónicos); ($M=Cu, Ag, Au$; $x=1$ ó 4).

En la Figura 5.11 se reportan las geometrías optimizadas para los sistemas que contienen átomos y cúmulos metálicos neutros, y se reportan las distancias M-SIL para cada caso (M=Cu, Ag, Au). En las estructuras más estables, los átomos y los cúmulos se sitúan por debajo del anillo aromático B de la SIL e interactúan con el átomo de oxígeno en posición R₃. Las distancias M-SIL son más cortas para los sistemas de Cu que para los sistemas de Ag y Au. En la estructura más estable de SIL-Au₄, se observa que el cúmulo interactúa con el átomo de hidrógeno de la posición R₃-CO. La estabilización de esta estructura puede deberse al puente de hidrógeno no convencional entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo en posición R₃ y un átomo de Au. Estas interacciones han sido reportadas y se sabe que pueden estabilizar sistemas moleculares.^{169,170}

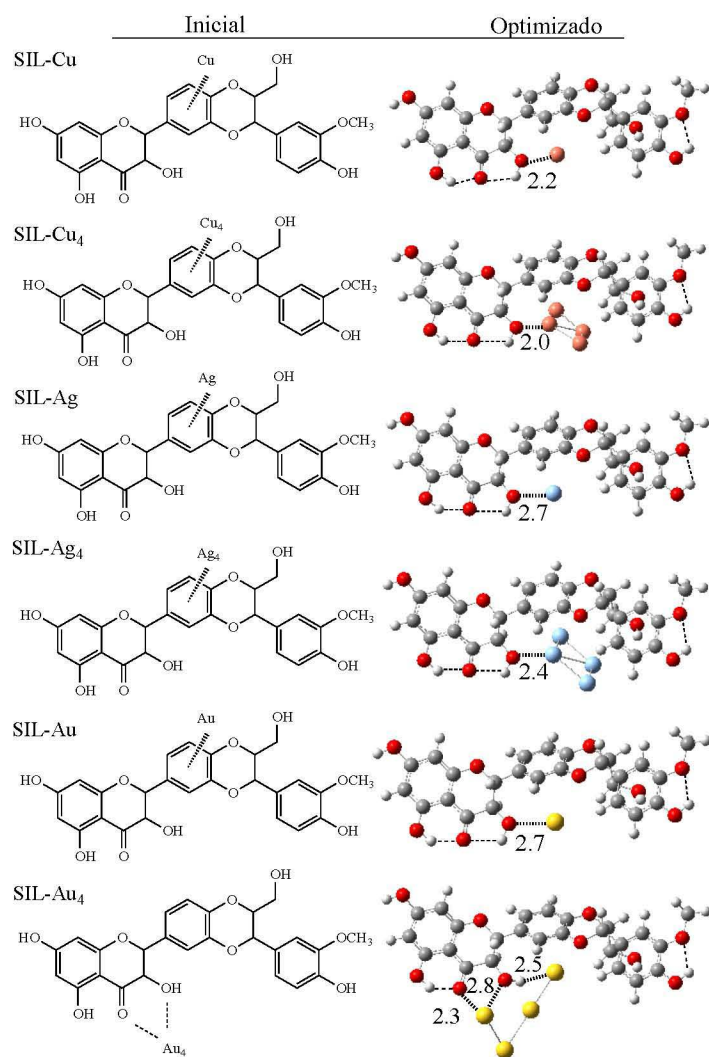


Figura 5.11. Fórmula estructural y geometrías optimizadas más estables para los sistemas SIL-M_x (M=Cu, Ag, Au; x=1 ó 4).

En la Figura 5.12 se muestran las estructuras optimizadas más estables de los sistemas $[\text{SIL-M}_x]^+$ con $\text{M}=\text{Cu}$, Ag y Au , $x=1$ ó 4 . Se reportan también las distancias SIL-M en Å. Para los sistemas catiónicos, los átomos y cúmulos se sitúan preferentemente en el anillo D (Figura 5.1) de la SIL y las distancias son más cortas para los sistemas de Cu que para los de Ag y Au .

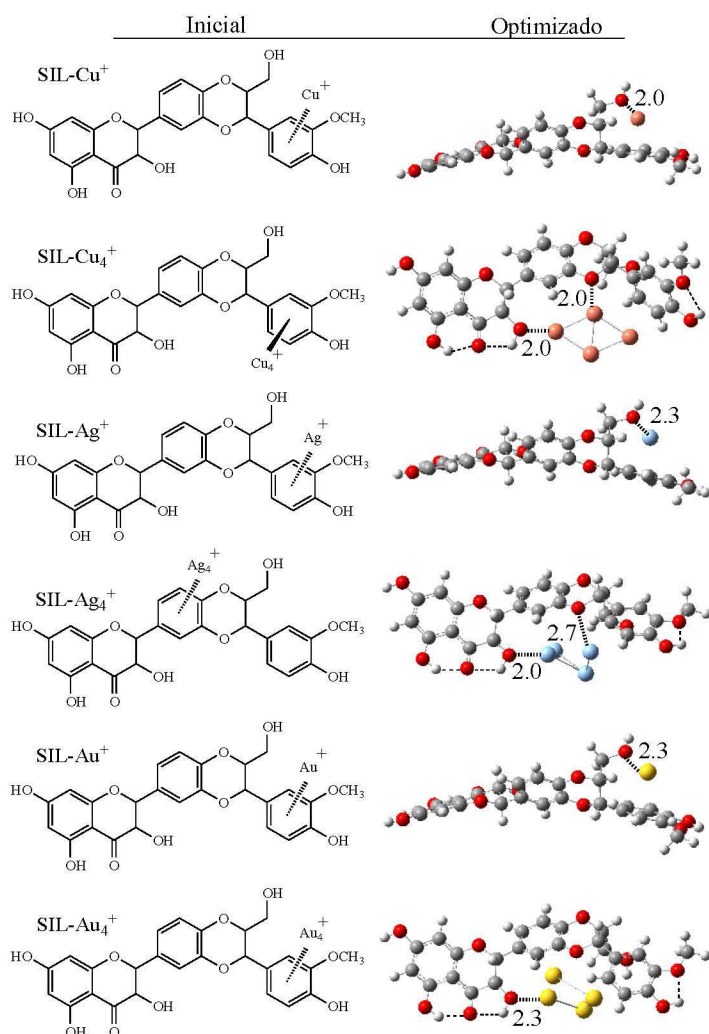


Figura 5.12. Fórmulas estructurales y geometrías optimizadas más estables para los sistemas $[\text{SIL-M}_x]^+$ ($\text{M}=\text{Cu}$, Ag , Au ; $x=1$ ó 4).

Con el fin de identificar la zona más probable para la interacción entre átomos y cúmulos metálicos con $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ se determinó el Mapa de Potencial Electrostático de la molécula orgánica, con el fin de identificar la zona más susceptible para que se produzca la interacción de esta molécula con átomos y cúmulos metálicos. En la Figura 5.13 se reporta

la estructura optimizada de la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ con las distancias de enlace de los puentes de hidrógeno intramoleculares, el Mapa de Potencial Electroestático obtenido a partir de la densidad electrónica correspondiente y la fórmula estructural más probable de interacción entre la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ y los átomos y cúmulos metálicos. La región negativa y rica en electrones de la molécula, indicada en rojo en el Mapa de Potencial Electroestático sugiere que la posición más propicia para la interacción con los metales es en el átomo de oxígeno en posición R₇. Se conoce que la primera desprotonación de la SIL ocurre en el hidroxilo en esa posición, por lo que parece probable que la interacción se lleve a cabo en ese sitio.

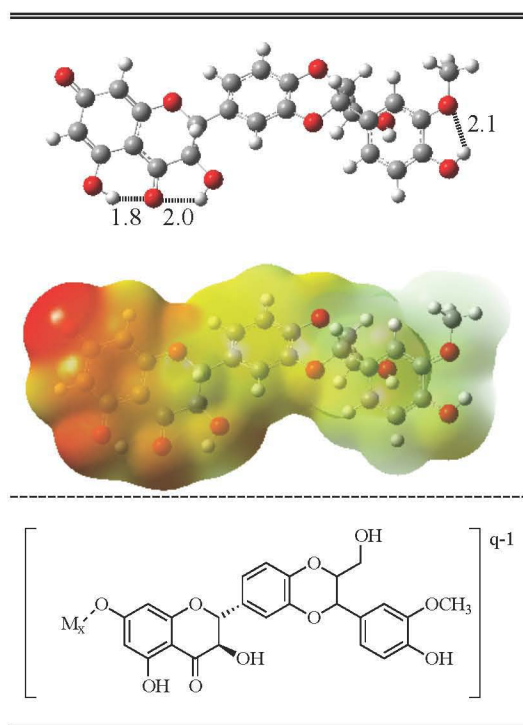


Figura 5.13. Estructura optimizada más estable de $[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{M}_x]^{-1}$, el Mapa de Potencial Electroestático y la fórmula estructural de $[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{M}_x]^{q-1}$ donde se llevaron a cabo las adiciones de átomos y cúmulos metálicos. (M=Cu, Ag, Au; x=1 ó 4, q=0 ó 1).

En la Figura 5.14 se presentan las estructuras optimizadas de la interacción de $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ con los átomos y cúmulos metálicos. Los términos “aniónico” y “neutro” corresponden a la carga total del sistema. Se reportan las distancias de enlace M-O, las distancias son más cortas para las estructuras cargadas que para las neutras. Además, en todas las geometrías optimizadas, los tres puentes de hidrógeno intramoleculares característicos de la SIL se encuentran presentes.

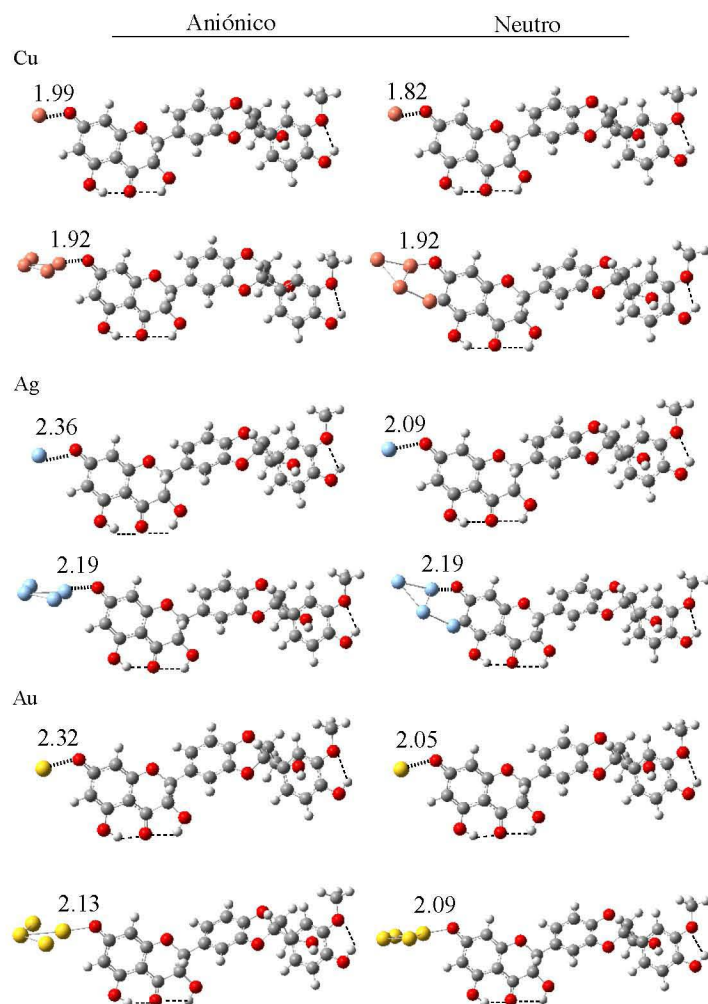


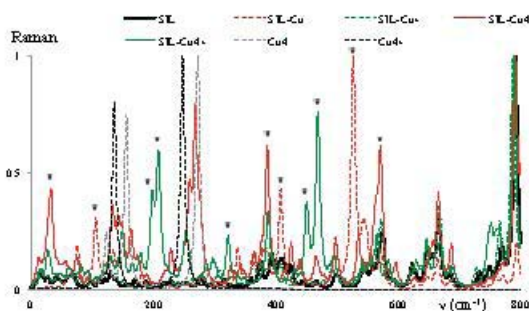
Figura 5.14. Estructuras más estables de $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_x]^{q-1}$ ($\text{M}=\text{Cu}, \text{Ag}, \text{Au}; x=1 \text{ ó } 4, q=0 \text{ ó } 1$).

En la Tabla 5.2 se reportan las energías libres de Gibbs para las reacciones de formación de los sistemas de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ con átomos y cúmulos metálicos. Todas las reacciones estudiadas son exergónicas. Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que las reacciones con cúmulos están más favorecidas termodinámicamente que con átomos, las de $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ más que las de SIL, y las reacciones de los sistemas cargados son más exergónicas que aquellas que contienen sistemas metálicos. Los sistemas de Cu están más favorecidos que los de Ag y Au.

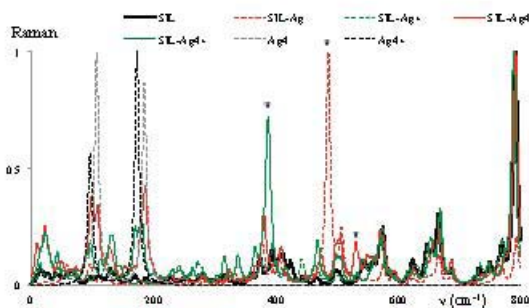
Tabla 5.2. Energías libres de Gibbs, ΔG (kcal/mol), para las siguientes reacciones: $M_x^q + \text{SIL} \rightarrow \text{SIL}-M_x^q$ y $M_x^q + [\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}-M_x]^{q-1}$ (M es Cu, Ag ó Au, x es 1 ó 4 y q es 0 ó +1).

<i>Molécula</i>	<i>ΔG</i>	<i>Molécula</i>	<i>ΔG</i>
SIL-Cu	-7.4	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Cu}]^{-1}$	-15.7
SIL-Cu ⁺	-81.8	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Cu}]^0$	-148.2
SIL-Cu ₄	-20.7	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Cu}_4]^{-1}$	-31.1
SIL-Cu ₄ ⁺	-52.6	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Cu}_4]^0$	-124.7
SIL-Ag	-2.8	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Ag}]^{-1}$	-8.0
SIL-Ag ⁺	-54.4	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}-\text{Ag}]^0$	-124.8
SIL-Ag ₄	-11.9	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Ag}_4]^{-1}$	-22.6
SIL-Ag ₄ ⁺	-34.2	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Ag}_4]^0$	-103.5
SIL-Au	-2.7	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Au}]^{-1}$	-10.8
SIL-Au ⁺	-71.0	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Au}]^0$	-146.4
SIL-Au ₄	-18.3	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Au}_4]^{-1}$	-30.2
SIL-Au ₄ ⁺	-47.9	$[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{Au}_4]^0$	-113.5

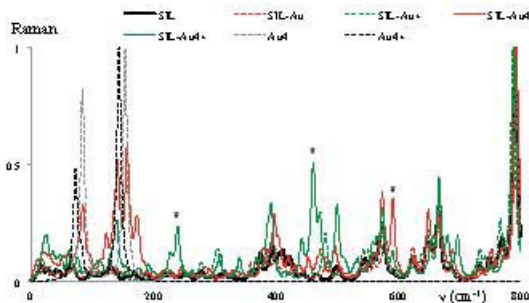
La inclusión de átomos y cúmulos metálicos para incrementar las señales de los espectros Raman de moléculas orgánicas es una técnica utilizada comúnmente.¹⁴⁰ En las Figuras 5.15 y 5.16 se presentan los espectros Raman de los sistemas de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, respectivamente. Las señales más importantes de cada sistema se indican con una estrella (*) y una tabla que resume esta información acompaña cada uno de los espectros. A partir de un átomo de Cu, Ag o Au hay cambios apreciables en los espectros. Los espectros de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ sin metales tienen una menor intensidad comparados con aquellos donde hay metales. Para los espectros de los sistemas con $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ se observa que la señal en 343 cm^{-1} desaparece por la presencia de los átomos y cúmulos metálicos. Las señales de los metales aparecen en frecuencias menores a 300 cm^{-1} , por lo que el incremento en las señales de los espectros se debe a la interacción de los átomos y cúmulos con la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$.



Sistema	ν (cm ⁻¹)
SIL-Cu _x ⁰	
SIL-Cu	105, 407, 526
SIL-Cu ⁺	-
SIL-Cu ₄	31, 385, 570
SIL-Cu ₄ ⁺	197, 207, 320, 449, 468
Cu _x and Cu _x ⁺	Señales menores a 300 cm ⁻¹

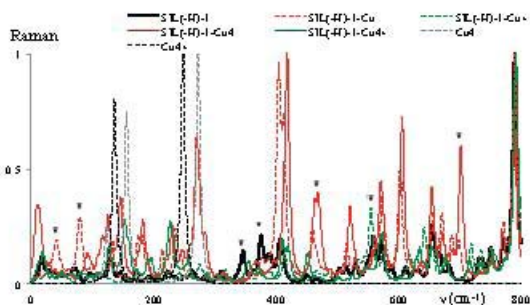


Sistema	ν (cm ⁻¹)
SIL-Ag _x ⁰	
SIL-Ag	485
SIL-Ag ⁺	-
SIL-Ag ₄	528
SIL-Ag ₄ ⁺	386
Ag _x and Ag _x ⁺	Señales menores a 200 cm ⁻¹

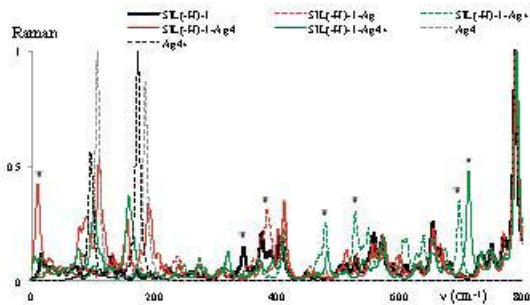


Sistema	ν (cm ⁻¹)
SIL-Au _x ⁰	
SIL-Au	-
SIL-Au ⁺	-
SIL-Au ₄	590
SIL-Au ₄ ⁺	238, 460
Au _x and Au _x ⁺	Señales menores a 200 cm ⁻¹

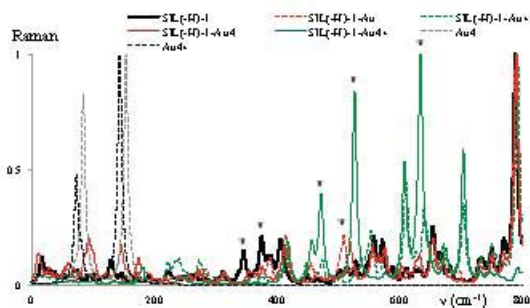
Figura 5.15. Espectros Raman correspondientes a los sistemas más estables con SIL, y las señales más importantes.



Sistema	ν (cm ⁻¹)
[SIL ₍₄₀₎ -Cu ₄] ^q	
[SIL ₍₄₀₎ -Cu ₄] ¹	38, 77
[SIL ₍₄₀₎ -Cu ₄] ⁰	553
[SIL ₍₄₀₎ -Cu ₄] ¹	462, 701
[SIL ₍₄₀₎ -Cu ₄] ⁰	-
Cu ₄ and Cu ₄ ⁺	Señales menores a 300 cm ⁻¹



Sistema	ν (cm ⁻¹)
[SIL ₍₄₀₎ -Ag ₄] ^q	
[SIL ₍₄₀₎ -Ag ₄] ¹	382
[SIL ₍₄₀₎ -Ag ₄] ⁰	478, 527, 697
[SIL ₍₄₀₎ -Ag ₄] ¹	9
[SIL ₍₄₀₎ -Ag ₄] ⁰	712
Ag ₄ and Ag ₄ ⁺	Señales menores a 200 cm ⁻¹



Sistema	ν (cm ⁻¹)
[SIL ₍₄₀₎ -Au ₄] ^q	
[SIL ₍₄₀₎ -Au ₄] ¹	519
[SIL ₍₄₀₎ -Au ₄] ⁰	-
[SIL ₍₄₀₎ -Au ₄] ¹	-
[SIL ₍₄₀₎ -Au ₄] ⁰	471, 526, 634
Au ₄ and Au ₄ ⁺	Señales menores a 200 cm ⁻¹

Figura 5.16. Espectros Raman correspondientes a los sistemas más estables con [SIL₍₄₀₎]¹, y las señales más importantes.

En las Figuras 5.17 y 5.18 se presentan los FEDAM para los sistemas de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ interaccionando con átomos y cúmulos metálicos, respectivamente. Además, los mapas incluyen la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ y los radicales libres $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{DPPH}\bullet$ para hacer comparaciones. La transferencia de electrón se lleva a cabo de los buenos donadores a los buenos aceptores.

En la Figura 5.17 se observa que la presencia de los átomos de Cu, Ag y Au cambia las propiedades de la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ para donar y aceptar un electrón. En general, estos sistemas son mejores donadores, es decir que tienen menores energías de ionización que la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Algunos sistemas son también mejores aceptores de electrones, pues tienen mayores afinidades electrónicas. La capacidad para donar y aceptar un electrón cambia de acuerdo con la carga del sistema. Los sistemas que contienen átomos metálicos neutros (SIL-M y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}]^{-1}$) son mejores donadores y, con excepción de los sistemas de Cu, también mejores aceptores de electrones. Los sistemas de Cu son mejores donadores que los de Ag y Au, mientras que los compuestos de Au son mejores aceptores que los de Cu y Ag. Todos los sistemas estudiados son capaces de estabilizar los radicales libres $\bullet\text{OOH}$ y $\text{NO}_2\bullet$ esto porque están abajo a la izquierda de estos radicales. Sólo los sistemas neutros (SIL-M y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}]^{-1}$) son capaces de estabilizar el $\text{DPPH}\bullet$. La presencia de los átomos de Cu, Ag y Au mejora la capacidad para donar y aceptar un electrón de la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ por lo que estos sistemas con átomos metálicos son mejores compuestos antioxidantes.

En la Figura 5.18 se reporta el FEDAM para los sistemas con cúmulos de cuatro átomos de Cu, Ag y Au. La presencia de los tetrámeros metálicos mejora la capacidad para donar y aceptar un electrón de la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Todos los sistemas son mejores donadores que la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ y en general estos sistemas son también mejores aceptores de electrones. Los sistemas de Cu son los mejores donadores, pues tienen las energías de ionización más bajas del mapa, mientras que los compuestos de Au son los mejores aceptores de electrones debido a sus mayores afinidades electrónicas. Todos los sistemas estabilizan los radicales libres $\bullet\text{OOH}$ y $\text{NO}_2\bullet$, pero sólo algunos estabilizan el $\text{DPPH}\bullet$. La presencia de los cúmulos metálicos mejora la capacidad para donar y aceptar un electrón de la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ por lo que estos sistemas podrían ser mejores compuestos antioxidantes.

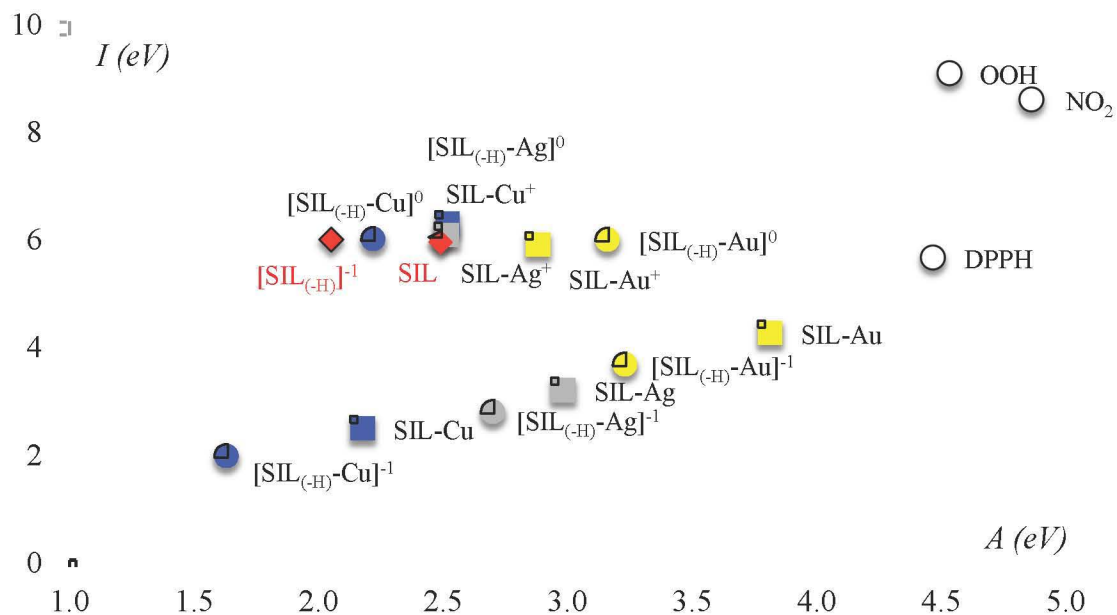


Figura 5.17. FEDAM en agua para SIL y $[SIL_{(-H)}]^{-1}$, y los sistemas $[SIL-M]^q$ y $[SIL_{(-H)}-M]^{q-1}$ ($M=Cu, Ag$ ó Au ; $q=0$ ó 1). Se incluyen algunos radicales libres para llevar a cabo las comparaciones pertinentes.

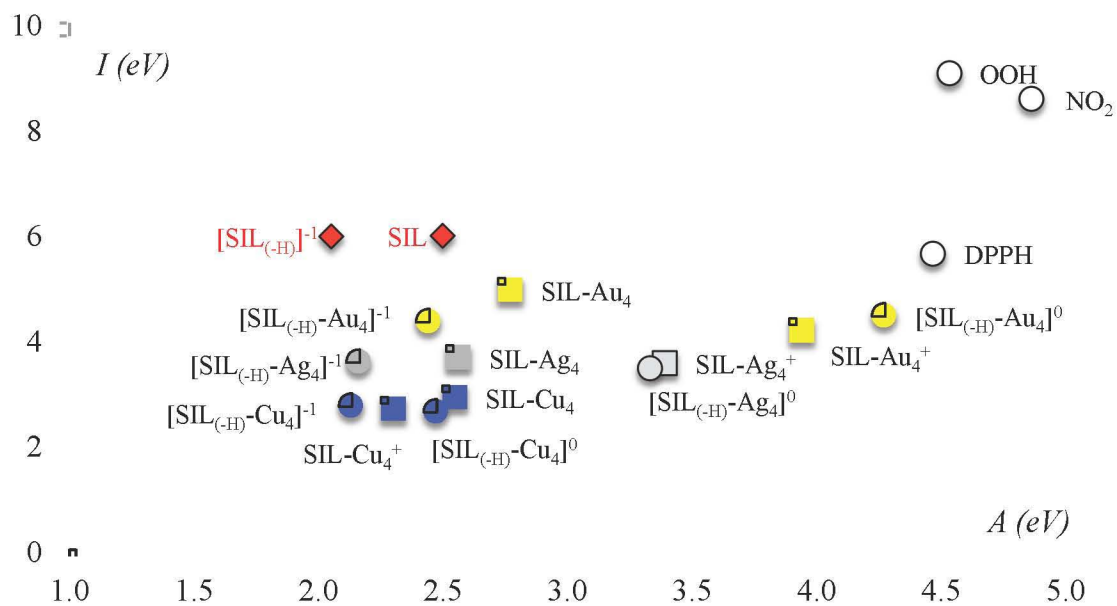


Figura 5.18. FEDAM en agua para SIL y $[SIL_{(-H)}]^{-1}$, y los sistemas $[SIL-M_4]^q$ y $[SIL_{(-H)}-M_4]^{q-1}$ ($M=Cu, Ag$ ó Au ; $q=0$ ó 1). Se incluyen algunos radicales libres para llevar a cabo las comparaciones pertinentes.

Uno de los aspectos más interesantes de la interacción de átomos y cúmulos metálicos con la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ fue la de analizar cómo la presencia de los cúmulos metálicos modifica la distribución global de carga. Se analizó cómo la carga neta de los sistemas puede afectar la distribución de carga en la molécula de SIL. Los Mapas de Potencial Electrostático permiten el análisis de las zonas ricas (rojas) y deficientes (azules) en electrones y predecir con precisión los sitios susceptibles de ataques nucleofílicos y electrofílicos. En este caso en particular, los mapas se obtuvieron para evaluar cómo se modifica la distribución global de carga en la SIL debido a la presencia de los cúmulos metálicos.

En la Figura 5.19 se presentan los Mapas de Potencial Electrostático de los sistemas de Cu_4 con SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Los resultados con los otros metales son prácticamente iguales y por esa razón no se muestran en este trabajo. Cuando se observan los mapas de SIL-Cu_4 y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^{-1}$ y se comparan con los de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, respectivamente, se observa que la presencia del tetrámero de Cu no altera la distribución total de carga en el sistema por lo que podría tener una reactividad similar. Sin embargo, una vez que se comparan los mapas de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ con los de los sistemas con carga (SIL-Cu_4^+ y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^0$), los cúmulos pierden carga, mientras que en la parte orgánica del sistema ésta se acumula. Se puede suponer que si la distribución de carga se altera, también lo hará la reactividad de estos sistemas.

La reactividad de los sistemas se encuentra relacionada con la actividad biológica y la presencia de los átomos y cúmulos cargados podría modificar las propiedades conocidas de la SIL. En este sentido, los Mapas de Potencial Electrostático abren la posibilidad de estudiar más a fondo la reactividad de estos sistemas.

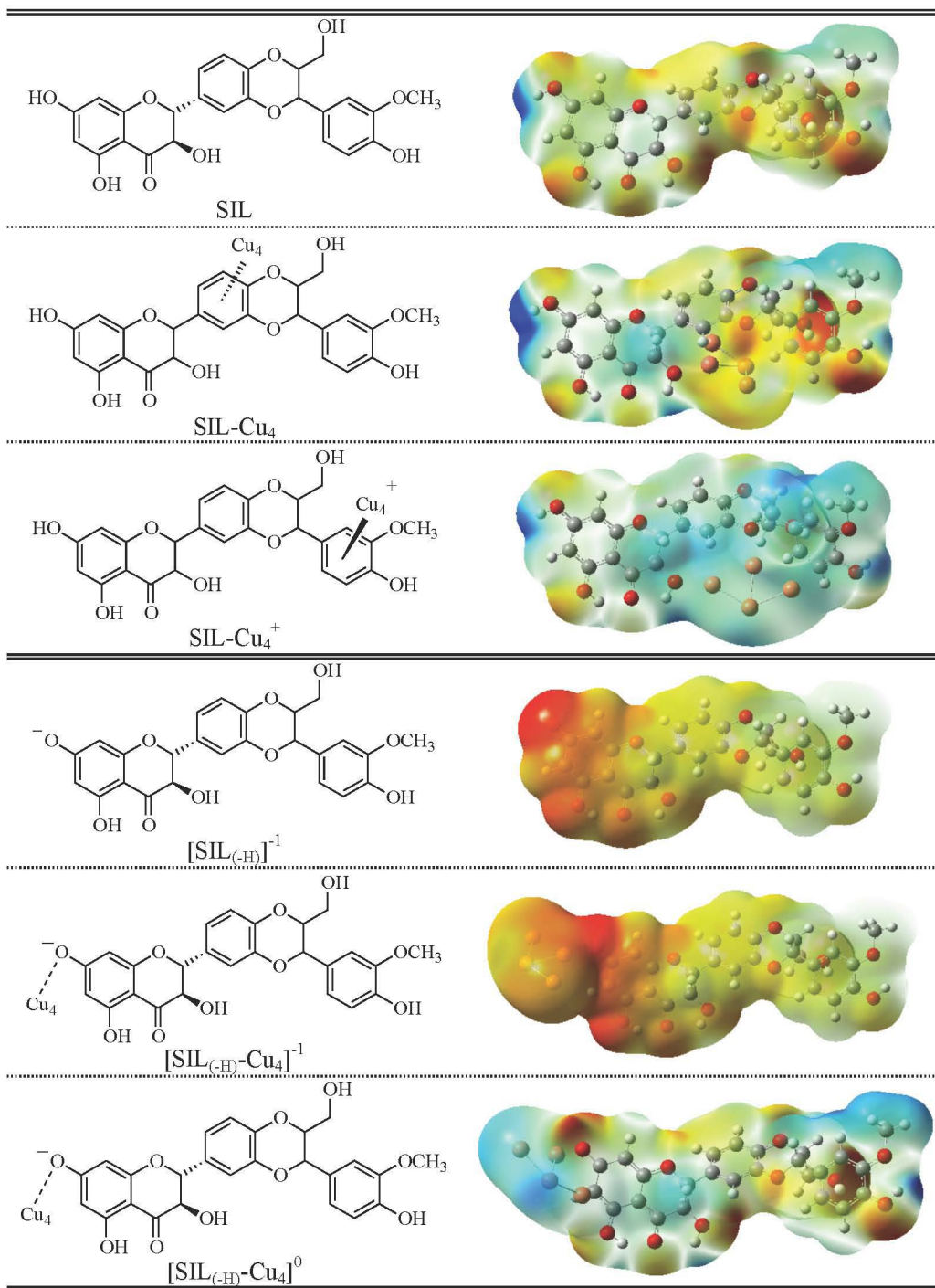


Figura 5.19. Fórmulas estructurales de SIL y [SIL_(-H)]⁻¹ y de los sistemas más estables de interacción con Cu₄ y sus Mapas de Potencial Electrostatico.

IV. SISTEMAS SIL-M₄ (M=Cu, Ag, Au)

Además del mecanismo SET y los mapas de potencial electrostáticos se investigaron los mecanismos RAF y HAT para los sistemas de SIL y [SIL_(-H)]⁻¹ interaccionando con los tetrámeros de Cu, Ag y Au con el fin de analizar otros mecanismos de reactividad y establecer si la presencia de metales incrementa la capacidad antioxidante de estos sistemas.

En la Figura 5.20, se presentan las estructuras optimizadas más estables de los sistemas SIL-M₄ y [SIL-M₄]^{+•}, M=Cu, Ag y Au. En estos sistemas, el cúmulo se sitúa cercano a los anillos C y B de la SIL (Figura 5.1). Las distancias de enlace son más cortas para los sistemas cargados que para los neutros. La Figura 5.21 reporta las estructuras optimizadas más estables de los sistemas [SIL_(-H)-M₄]⁻¹ y [SIL_(-H)-M₄][•]. El protón más ácido de la SIL se sitúa en la posición R₇ (Figura 5.1). En las estructuras más estables de los sistemas [SIL_(-H)-M₄]⁻¹ y [SIL_(-H)-M₄][•] los tetrámeros metálicos de Cu, Ag y Au interaccionan con el oxígeno con carga negativa en la posición R₇ de la SIL. Se optimizaron otras geometrías iniciales pero resultaron ser menos estables.¹⁷¹ Las estructuras de las Figuras 5.20 y 5.21 son los reactivos de los mecanismos para RAF y HAT que se estudian a continuación.

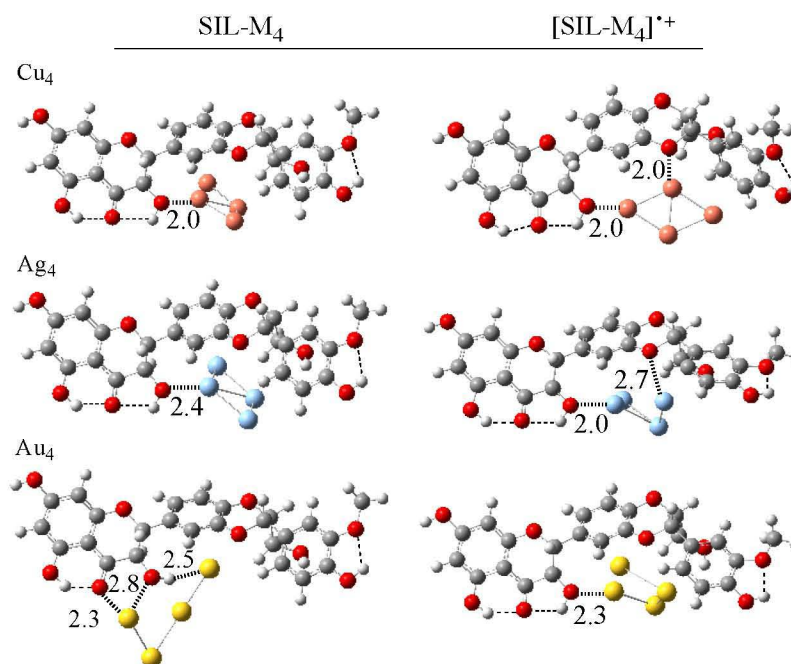


Figura 5.20. Estructuras optimizadas de los sistemas SIL-M₄ y [SIL-M₄]^{+•}.

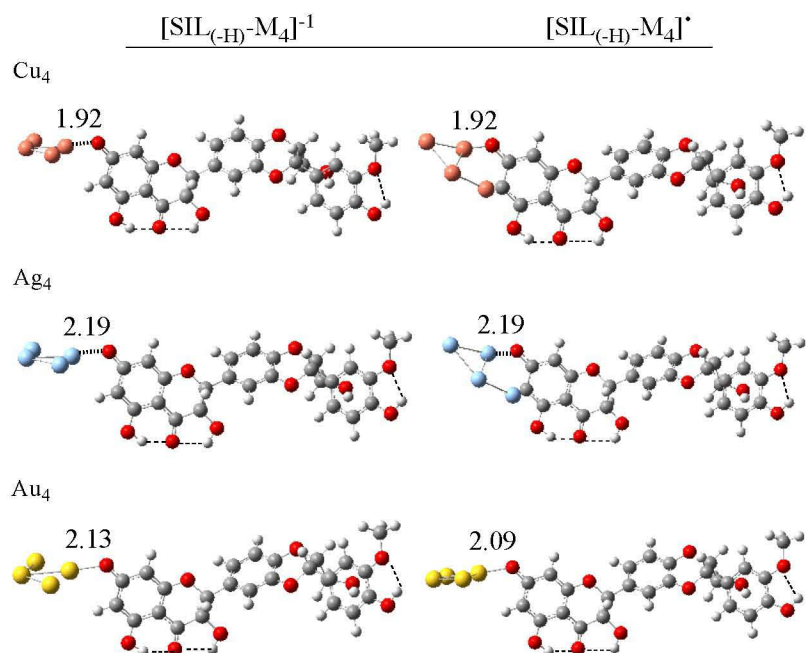


Figura 5.21. Estructuras optimizadas de los sistemas $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}$ y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{\bullet}$.

Para estudiar el mecanismo RAF, el radical libre se enlazó a todos los átomos de carbono que tienen doble enlace de las moléculas SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ y directamente a los átomos de Cu, Ag y Au. En las Figuras 5.22 a 5.25 se presentan las estructuras más estables, con el radical libre enlazado a la molécula y al cúmulo metálico. También se reportan las diferencias de energía entre cada sistema. Para los sistemas $[\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^{\bullet}$ y $[\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^{+}$ se observa que las diferencias de energía son mayores en los compuestos cargados que en los neutros. En todas las estructuras más estables, el radical $\bullet\text{OOH}$ interacciona con el cúmulo. En algunas estructuras ($[\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^{\bullet}$, $[\text{SIL-Ag}_4\text{-OOH}]^{+}$ y $[\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^{+}$) se observan puentes de hidrógeno entre la SIL y el radical libre (indicados en las figuras como *PH).

Para los sistemas $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{\bullet-1}$ y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]$ las estructuras más estables contienen el radical libre interaccionando con el cúmulo. Todas presentan puentes de hidrógeno que se encuentran indicados como *PH.

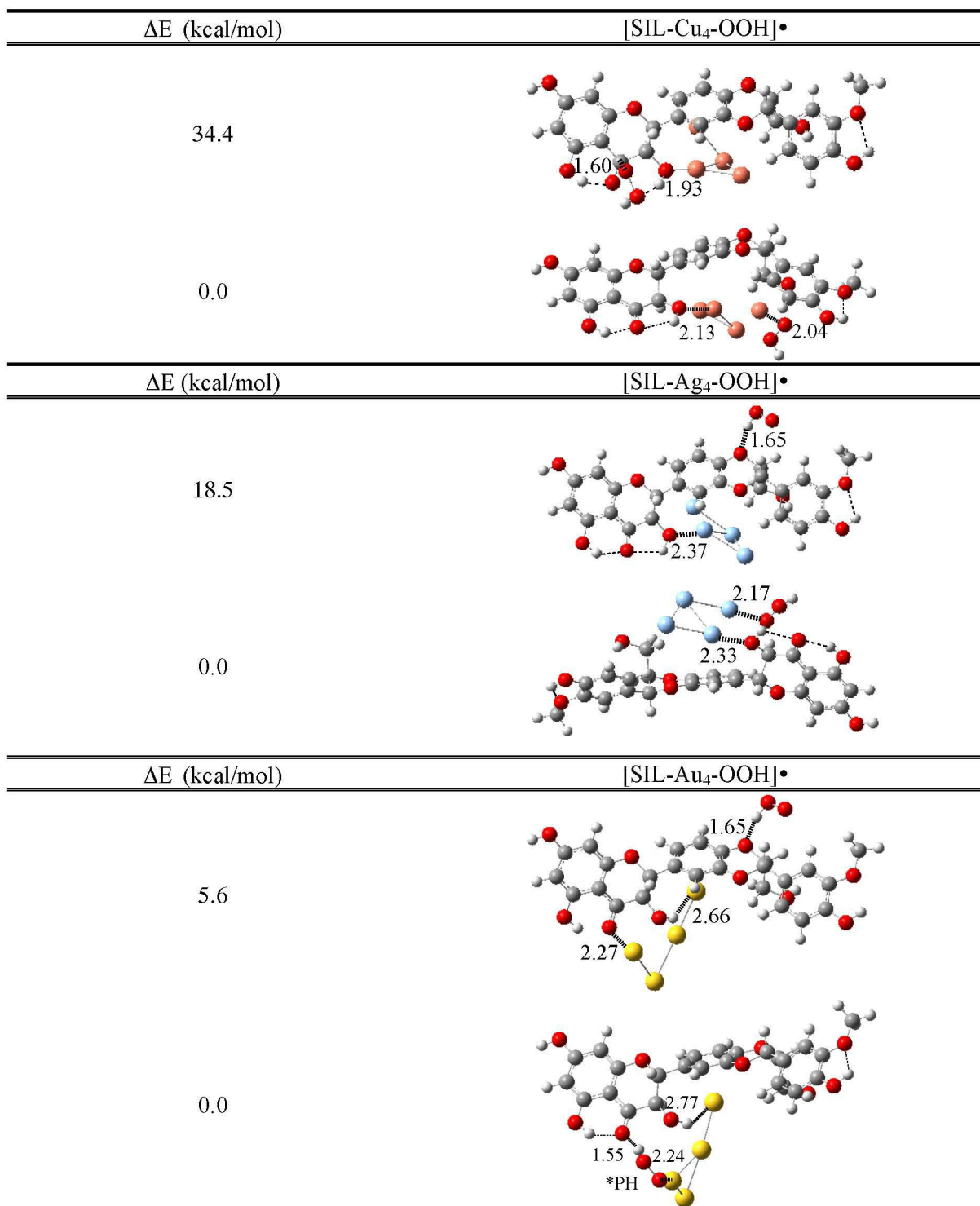


Figura 5.22. Geometrías optimizadas más estables para los sistemas [SIL-M₄-OOH]• (M=Cu, Ag, Au). *PH indica la formación de un puente de hidrógeno.

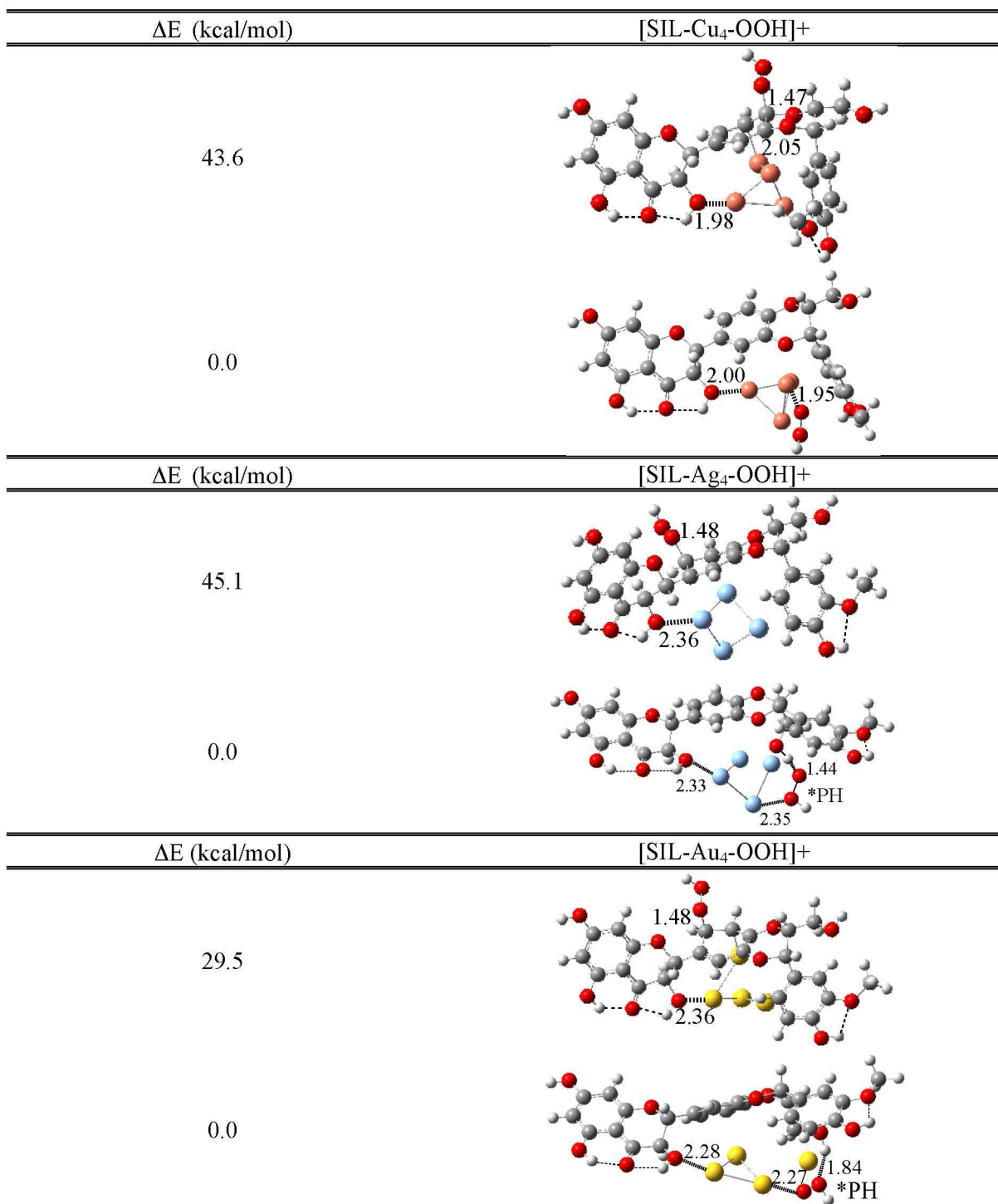


Figura 5.23. Geometrías optimizadas más estables para los sistemas [SIL-M₄-OOH]⁺ (M=Cu, Ag, Au). *PH indica la formación de un puente de hidrógeno.

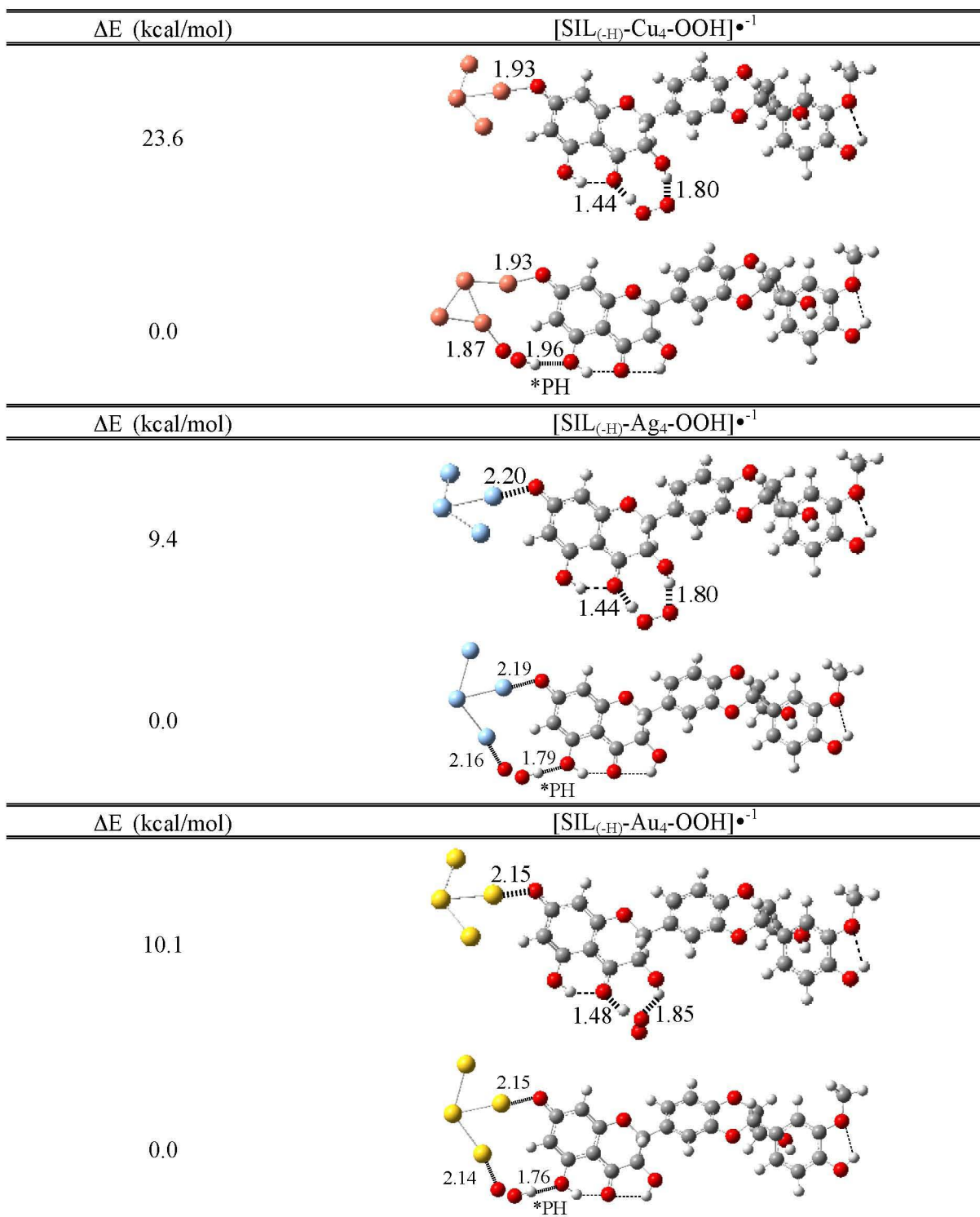


Figura 5.24. Geometrías optimizadas más estables para $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{\bullet-1}$ ($M=\text{Cu, Ag, Au}$). *PH indica la formación de un puente de hidrógeno.

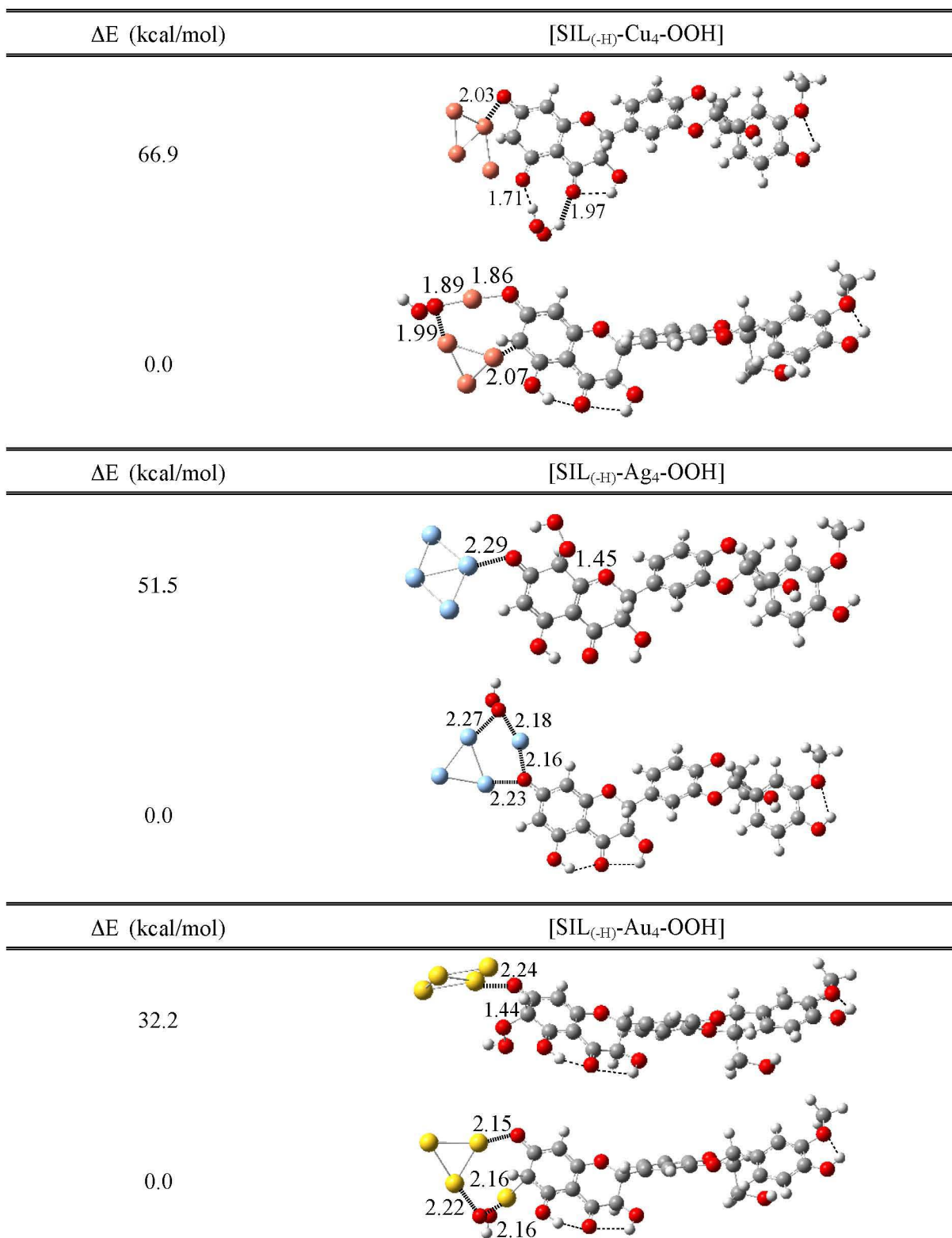


Figura 5.25. Geometrías optimizadas más estables para [SIL_(-H)-M₄-OOH] (M=Cu, Ag, Au).

En la Tabla 5.3 se reportan los valores de las energías libres de Gibbs para las reacciones de formación del aducto radical con el radical libre $\bullet\text{OOH}$. Los valores de las energías libres de Gibbs para las reacciones de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ con $\bullet\text{OOH}$ (sin la presencia de cúmulos metálicos) también se presentan para poder comparar.

Los valores negativos para ΔG_{RAF} indican que las reacciones son exergónicas y termodinámicamente favorecidas. Todas las reacciones de la tabla son exergónicas, por lo que los sistemas estudiados atrapan el radical libre $\bullet\text{OOH}$. Comparado con SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, los que tienen metales son mejores antioxidantes. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que la presencia de los tetrámeros de Cu, Ag y Au incrementa la capacidad antioxidante de las moléculas SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ en la mayoría de los casos.

Tabla 5.3. Valores de las energías libres de Gibbs (ΔG_{HAT}) para las reacciones del mecanismo RAF.

Reacción	ΔG_{RAF}
$\text{SIL} + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-OOH}]\bullet$	-2.8
$\text{SIL-Cu}_4 + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Cu}_4\text{-OOH}]\bullet$	-45.4
$\text{SIL-Ag}_4 + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Ag}_4\text{-OOH}]\bullet$	-23.0
$\text{SIL-Au}_4 + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]\bullet$	-3.8
$[\text{SIL-Cu}_4]^+ + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Cu}_4\text{-OOH}]^+$	-75.5
$[\text{SIL-Ag}_4]^+ + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Ag}_4\text{-OOH}]^+$	-52.0
$[\text{SIL-Au}_4]^+ + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^+$	-38.5
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1} + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-OOH}]\bullet^{-1}$	-14.5
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^{-1} + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4\text{-OOH}]\bullet^{-1}$	-33.0
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]^{-1} + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4\text{-OOH}]\bullet^{-1}$	-19.6
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]^{-1} + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4\text{-OOH}]\bullet^{-1}$	-13.3
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]\bullet + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4\text{-OOH}]$	-65.8
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]\bullet + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4\text{-OOH}]$	-43.8
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]\bullet + \bullet\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4\text{-OOH}]$	-48.4

La capacidad antioxidante de los sistemas mediante el mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) se investigó quitando uno por uno todos los átomos de hidrógeno correspondientes a los grupos hidroxilo de la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Se optimizó la geometría de estos sistemas deshidrogenados y la estructura más estable se utilizó para estudiar la capacidad de atrapar radicales libres.

La Tabla 5.4 muestra cada una de las reacciones estudiadas y los diferentes valores de las energías libres de Gibbs. Se estudiaron cuatro radicales libres ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, $\text{NO}_2\bullet$ y $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\bullet$) de diferente reactividad. Los productos de las reacciones para este mecanismo son H_2O , H_2O_2 , HNO_2 y $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, respectivamente. Los valores negativos de ΔG_{HAT} indican que las reacciones son exergónicas. Estos valores de ΔG_{HAT} son más negativos para los sistemas con cúmulos metálicos comparados con la SIL y con la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, lo que indica que estos procesos se encuentran más favorecidos termodinámicamente. Para los sistemas SIL-M₄ y $[\text{SIL-M}_4]\bullet^+$, sólo las reacciones de SIL-Au₄ con algunos radicales libres presenta valores positivos. Los mejores antioxidantes son los que tienen tetrámeros de Cu. Las reacciones de $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]\bullet$ con los cuatro radicales libres son exergónicas. Por último, los sistemas con la SIL presentan valores más negativos que aquellos que tienen la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Estos resultados sugieren que el mecanismo HAT podría ser predominante bajo condiciones ácidas donde la SIL no se encuentra desprotonada. La capacidad antioxidante de los sistemas con Cu es mejor ya que las reacciones son más exergónicas (valores más negativos) que para los sistemas de Ag y Au. En particular los sistemas SIL-Cu₄ y $[\text{SIL-Cu}_4]\bullet^+$ muestran ser buenos antioxidantes para los cuatro radicales libres que se estudiaron.

Tabla 5.4. Valores de las energías libres de Gibbs (ΔG_{HAT}) para las reacciones del mecanismo HAT.

Reacción	ΔG_{HAT} (kcal/mol)				
	R• =	$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OOH}$	$\text{NO}_2\bullet$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\bullet$
$\text{SIL} + \text{R}\bullet \rightarrow \text{SIL}(-\text{H})\bullet + \text{RH}$		-24.0	3.8	8.3	2.7
$\text{SIL-Cu}_4 + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL-Cu}_4](-\text{H})\}\bullet + \text{RH}$		-43.3	-15.5	-11.0	-16.6
$\text{SIL-Ag}_4 + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL-Ag}_4](-\text{H})\}\bullet + \text{RH}$		-40.3	-12.5	-8.0	-13.6
$\text{SIL-Au}_4 + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL-Au}_4](-\text{H})\}\bullet + \text{RH}$		-23.6	4.2	8.7	3.1
$[\text{SIL-Cu}_4]\bullet^+ + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL-Cu}_4](-\text{H})\}^+ + \text{RH}$		-61.5	-33.7	-29.2	-34.8
$[\text{SIL-Ag}_4]\bullet^+ + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL-Ag}_4](-\text{H})\}^+ + \text{RH}$		-61.4	-33.6	-29.1	-34.7
$[\text{SIL-Au}_4]\bullet^+ + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL-Au}_4](-\text{H})\}^+ + \text{RH}$		-41.9	-14.1	-9.6	-15.2
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1} + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}](-\text{H})\}^{-1} + \text{RH}$		-27.3	0.5	5.0	-0.6
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^{-1} + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4](-\text{H})\}^{-1} + \text{RH}$		-28.6	-0.8	3.7	-1.9
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]^{-1} + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4](-\text{H})\}^{-1} + \text{RH}$		-26.8	1.0	5.5	-0.1
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]^{-1} + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4](-\text{H})\}^{-1} + \text{RH}$		-25.0	2.8	7.3	1.7
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]\bullet + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4](-\text{H})\} + \text{RH}$		-32.8	-5.0	-0.5	-6.1
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]\bullet + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4](-\text{H})\} + \text{RH}$		-26.8	1.0	5.5	-0.1
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]\bullet + \text{R}\bullet \rightarrow \{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4](-\text{H})\} + \text{RH}$		-25.6	2.2	6.7	1.1
	RH =	H_2O	H_2O_2	HNO_2	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$

Con el propósito de analizar si los sistemas una vez deshidrogenados o formando el aducto radical pueden funcionar como buenos donadores o aceptores de electrones, y así seguir atrapando radicales libres, se estudió el mecanismo de transferencia electrónica (SET) para los productos más estables derivados de los mecanismos de RAF y HAT. Se construyeron los mapas que se presentan en las Figuras 5.26 y 5.27, donde también se incluyen los productos deshidrogenados y formando el aducto radical de SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ para poder llevar a cabo las comparaciones necesarias.

La Figura 5.26 reporta el FEDAM para los productos del RAF. Como era de esperarse, todos los sistemas que contienen metales son mejores donadores y peores aceptores de electrones que los productos $[\text{SIL}-\text{OOH}]^{\bullet}$ y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}-\text{OOH}]^{\bullet-1}$. La única excepción es $[\text{SIL}-\text{Au}_4-\text{OOH}]^{\bullet}$. La presencia de los metales mejora las propiedades antioxidantes de la silibina pues, en general, disminuye la energía de ionización y aumenta la afinidad electrónica.

En la Figura 5.27 se muestra el FEDAM para los productos del HAT. Los sistemas deshidrogenados con cúmulos metálicos son mejores sistemas antioxidantes que los productos deshidrogenados de la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, $(\text{SIL}(-\text{H}))^{\bullet}$ y $\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}](-\text{H})\}^{\bullet-1}$ debido a sus menores energías de ionización. El producto deshidrogenado $\{[\text{SIL}-\text{Au}_4](-\text{H})\}^+$ es la única excepción, pues su energía de ionización es mayor que la de $\text{SIL}(-\text{H})^{\bullet}$ y la de $\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}](-\text{H})\}^{\bullet-1}$.

De los resultados obtenidos se puede decir que los productos derivados de los mecanismos RAF y HAT pueden ser buenos antioxidantes en términos de su capacidad para donar y aceptar electrones. De manera general, los sistemas que contienen Cu en estado de oxidación 0 son mejores donadores y los que tienen Au, sin importar el estado de oxidación, son mejores aceptores.

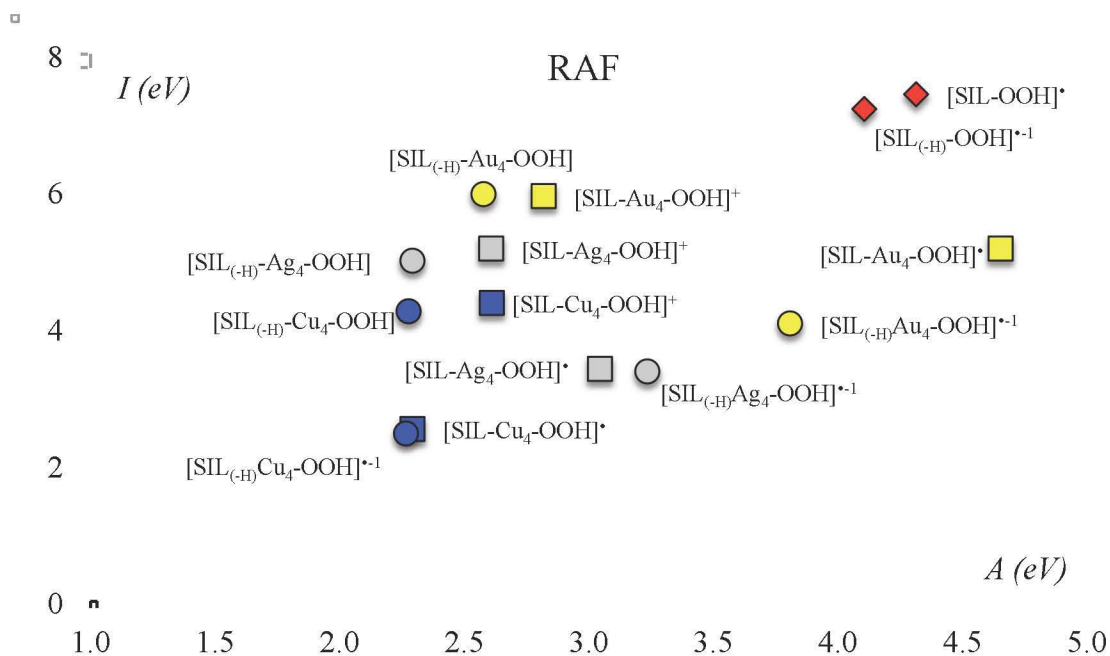


Figura 5.26. FEDAM para los productos más exergónicos de las reacciones analizadas para el mecanismo RAF.

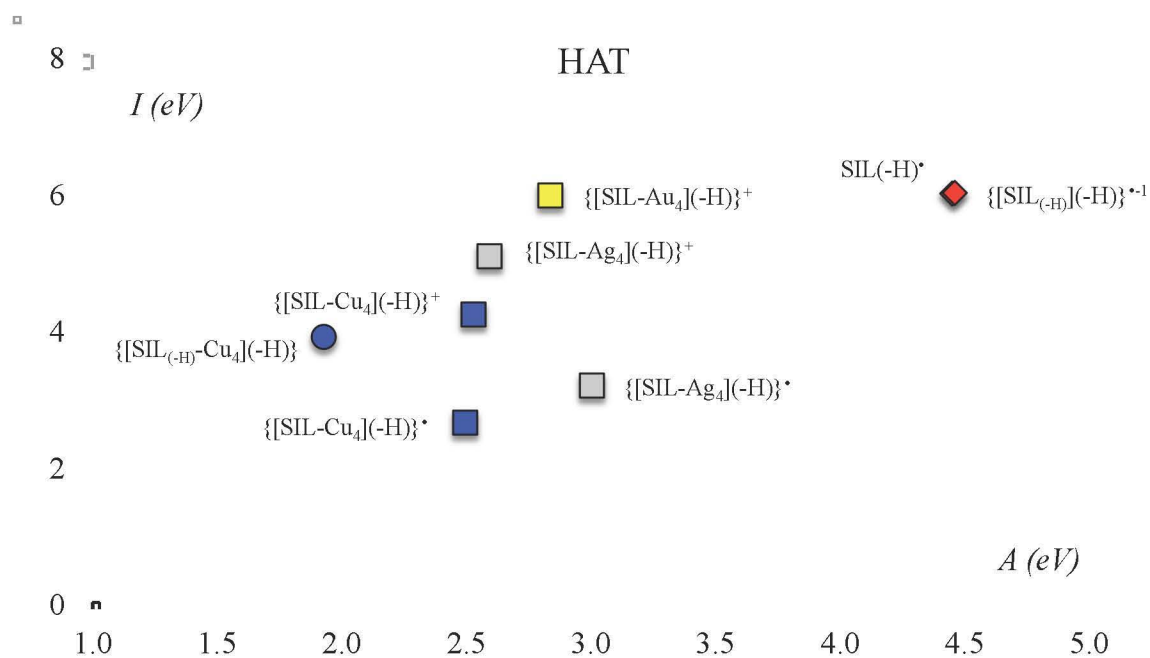


Figura 5.27. FEDAM para los productos más exergónicos de las reacciones analizadas para el mecanismo HAT.

- CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, los compuestos que contienen metales son mejores antioxidantes que la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ de acuerdo con los mecanismos SET, RAF y HAT. Se observa cómo la presencia de átomos y cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au incrementa la capacidad para donar y aceptar un electrón de la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$.

Con base en los resultados, se puede concluir que la presencia de átomos y cúmulos metálicos modifica los espectros Raman. Algunas señales se incrementan y aparecen otras nuevas debido a la interacción entre metales y la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$.

Además, el análisis de los Mapas de Potencial Electrostático sugiere que la presencia de los cúmulos metálicos neutros no cambia la distribución global de carga, mientras que los cúmulos cargados sí lo hace. Esto puede tener implicaciones en la reactividad global de los sistemas.

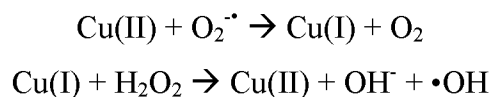
Los productos más estables de los mecanismos RAF y HAT son mejores donadores de electrones que las moléculas orgánicas sin cúmulos metálicos, pues tienen menores energías de ionización y mayores afinidades electrónicas que la SIL y su especie desprotonada. Los sistemas estudiados, una vez deshidrogenados o enlazados a un radical libre pueden todavía estabilizar radicales libres mediante el mecanismo SET.^{2*}

^{2*} Los resultados de esta sección se encuentran en los artículos publicados bajo los títulos *How the presence of metal atoms and clusters can modify the properties of Silybin? A computational prediction* y *Silybin interacting with Cu₄, Ag₄ and Au₄ clusters: do these constitute antioxidant materials?* por los autores Miguel Reina y Ana Martínez en la revista *Computational and Theoretical Chemistry*, volumen 1099, páginas 174-184 en el año 2017, y volumen 112, páginas 1-9 en el año 2017, respectivamente.

V. ¿ATRAPADORES DE Cu O DE RADICALES LIBRES?

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que se forman por la actividad metabólica y son importantes para la señalización celular.¹⁷² Muchas de estas especies son radicales libres que pueden reaccionar con biomoléculas como las proteínas o el ADN, y se sabe que causan una gran variedad de enfermedades.^{69-71,83,173-180} La concentración de ROS se puede incrementar significativamente en el cuerpo humano debido a la exposición a la radiación UV o a la presencia de concentraciones elevadas de cationes metálicos en el cuerpo, entre otros factores.^{181,182} Un exceso de ROS produce estrés oxidativo, que se genera por el desbalance entre la producción y la remoción de radicales libres y está correlacionado con numerosas enfermedades.^{69-71,83,180-190}

Los antioxidantes son las moléculas que atrapan radicales libres y con eso se puede disminuir el estrés oxidativo.¹⁸³⁻¹⁹⁰ De manera general, hay dos procesos involucrados en la estabilización de radicales libres. Por un lado están los antioxidantes que participan en las reacciones que se llevan a cabo directamente con las especies reactivas de oxígeno; y por otro, las reacciones de los antioxidantes con especies que generan radicales libres.¹⁹¹ Uno de los mecanismos antioxidantes para evitar la formación de radicales libres más importantes es la quelatación de Cu.^{143,156,171,192-194} El cobre es un elemento traza importante en el cuerpo humano. En promedio, el hígado adulto contiene de 18 a 45 microgramos de Cu por gramo de hígado seco, mientras que la sangre contiene aproximadamente 6 miligramos de Cu.^{21,22} Como todas las sustancias, el Cu puede ser benéfico o tóxico dependiendo de su concentración.²³ El cobre puede encontrarse en sus dos estados de oxidación más comunes, Cu(I) y Cu(II) y además puede oxidarse y reducirse pasando de un estado al otro. Se sabe que produce radicales hidroxilo vía la reacción de Haber-Weiss como se presenta a continuación:



Una pequeña concentración de Cu es capaz de generar grandes cantidades del radical libre hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) pues las especies Cu(II) y Cu(I) actúan como catalizadores de la reacción. Esta reacción se puede evitar con sustancias *atrapadoras* de Cu, como los antioxidantes que forman quelatos.

Una misma molécula antioxidante puede actuar como *atrapador* de radicales libres o como *atrapador* de Cu,^{143,157,195} dependiendo de los procesos termodinámicos y cinéticos involucrados. Por lo mismo, es importante comparar estos dos procesos, aunque en realidad pocas investigaciones lo hayan hecho.^{90,97} El objetivo principal de este trabajo es comparar la capacidad antioxidante para atrapar Cu y $\bullet\text{OH}$. En este estudio se analizarán cuatro moléculas antioxidantes conocidas: la silibina (SIL), la astaxantina (ASTA), la hormona melatonina (MELA) y uno de sus metabolitos, la ciclo 3-hidroximelatonina (3OHM). En la Figura 5.28 se presentan las fórmulas estructurales de estas sustancias.

Las cuatro moléculas antioxidantes provienen de fuentes distintas: SIL es un suplemento alimenticio, ASTA se encuentra en las verduras rojas principalmente, mientras que MELA y su metabolito 3OHM son hormonas producidas por el organismo. Los resultados experimentales y teóricos sobre la SIL sugieren que es un buen antioxidante.^{108-124,196-198} Sin embargo, los reportes de SIL quelatando metales son escasos.¹⁵⁷ La quelatación de metales por ASTA se ha estudiado desde el punto de vista teórico,^{96,97} y su capacidad antioxidante ha sido ampliamente estudiada y reportada.^{96,97,199,200} La MELA y la 3OHM presentan capacidad antioxidante, y ambas han sido reportadas como buenos *atrapadores* de Cu y de radicales libres.^{142,143,201}

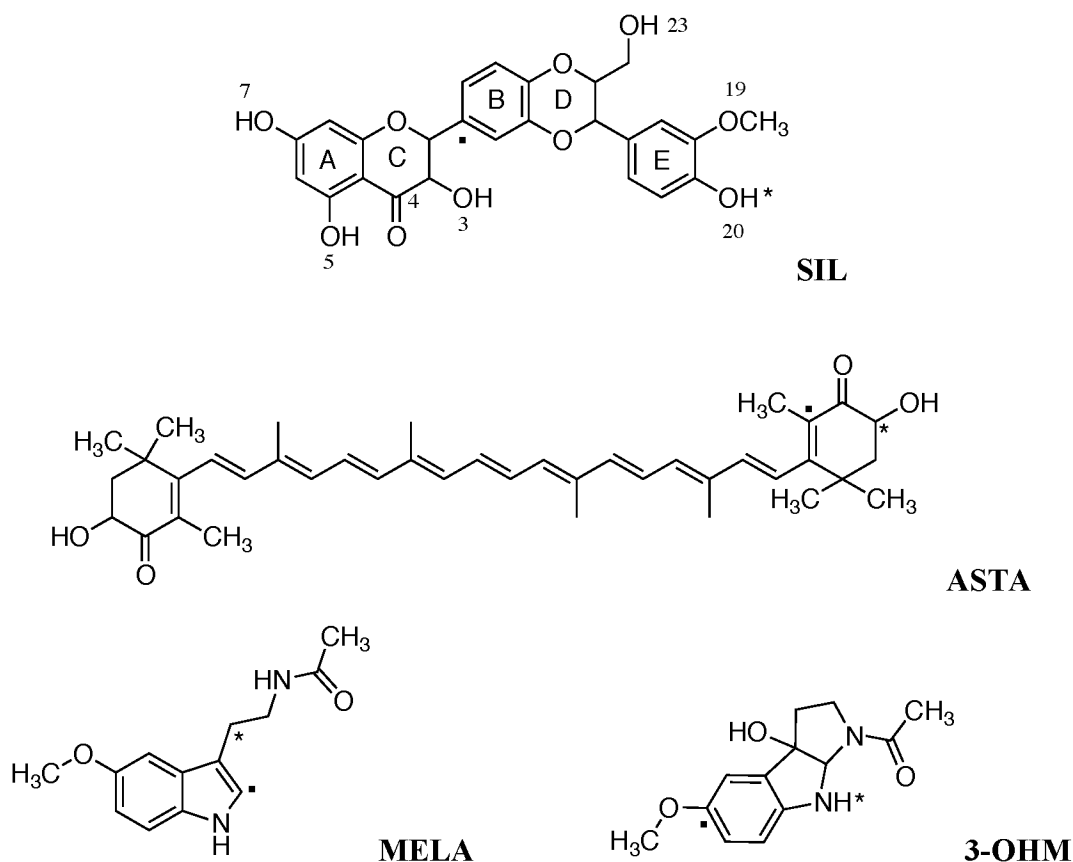


Figura 5.28. Fórmula estructural de la silibina (SIL), la astaxantina (ASTA), la melatonina (MELA) y la ciclo 3-hidroximelatonina (3OHM). El punto (■) indica la posición más favorecida para formar el aducto radical, y la estrella (*), la posición más estable de deshidrogenación.

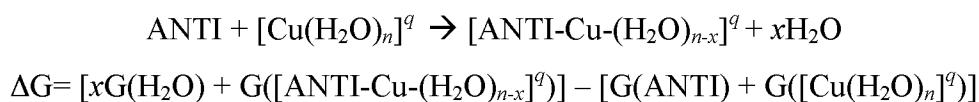
Para decidir si estas moléculas actúan preferentemente como *atrapadores* de radicales libres o como *atrapadores* de Cu, estudiamos la reacción con el radical libre •OH empleando dos mecanismos: la formación del aducto radical (RAF) y la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT). Para llevar a cabo este estudio se seleccionó el radical libre •OH porque es el que se genera por la reacción de Haber-Weiss y porque se trata de uno de los radicales libres más tóxicos y nocivos. La capacidad para atrapar Cu se analizó estudiando la capacidad de las cuatro moléculas antioxidantes (SIL, ASTA, MELA y 3OHM) para formar quelatos con Cu(II) y Cu(I).

1. DETALLES COMPUTACIONALES

Este estudio se realizó con el código Gaussian09 y la interfaz gráfica Gaussview5.¹⁵⁹ Todos los cálculos fueron efectuados utilizando la aproximación de la Teoría de Funcionales de la Densidad. Las geometrías se optimizaron con el nivel de teoría M06/6-31+G(d,p)^{147,160-163} utilizando agua como disolvente en el modelo de disolvente continuo SMD.¹⁶⁸ Esta metodología ha sido previamente utilizada y se ha comprobado su adecuado funcionamiento para modelar este tipo de sistemas.^{143,192} En todos los casos se llevó a cabo el análisis de frecuencias vibracionales para comprobar que todas fueran reales y asegurar que las geometrías de las estructuras optimizadas correspondieran a mínimos locales.

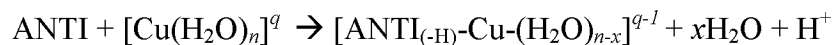
Para estudiar la quelatación de Cu se analizan dos posibles mecanismos: la quelatación directa y el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación. En el primero, las moléculas SIL, ASTA, MELA y 3OHM forman quelatos con Cu(II) y Cu(I) directamente, mientras que en el segundo, las moléculas son desprotonadas y a continuación, en el mismo sitio, forman el quelato.

Para el mecanismo directo, la energía libre de Gibbs se calculó siguiendo el siguiente esquema de reacción:



ANTI es la molécula antioxidante estudiada (SIL, ASTA, MELA o 3OHM); $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_n]^q$ representa al Cu enlazado a n moléculas de agua. Para Cu(II), el complejo se modeló con $n=4$ y $q=+2$, lo que quiere decir cuatro moléculas de agua coordinadas al Cu(II). En el caso de utilizar Cu(I), los valores son $n=2$ y $q=+1$.

Para el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación, las energías libres de Gibbs se obtuvieron de la siguiente forma:



$$\Delta G = [xG(\text{H}_2\text{O}) + G([\text{ANTI}_{(-\text{H})}\text{-Cu}(\text{H}_2\text{O})_{n-x}]^{q-1}) + G(\text{H}^+)] - [G(\text{ANTI}) + G([\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_n]^q)]$$

La descripción de los reactivos no cambia con respecto al mecanismo directo, pero en los productos ANTI_(-H) significa que la molécula antioxidante se encuentra desprotonada. El producto de la reacción $[\text{ANTI}_{(-\text{H})}\text{-Cu}(\text{H}_2\text{O})_{n-x}]^{q-1}$ representa el quelato con la molécula antioxidante desprotonada y para éste, q es igual a +1 ó 0 para Cu(II) y Cu(I), respectivamente. El valor de la energía libre de Gibbs para el protón es $G(\text{H}^+) = -270.28$ kcal/mol como lo sugiere Camaioni et al.²⁰²

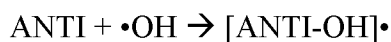
Para investigar los mecanismos HAT y RAF, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

HAT:



$$\Delta G = [G(\text{ANTI-H}_{(\text{HAT})}\bullet) + G(\text{H}_2\text{O})] - [G(\text{ANTI}) + G(\bullet\text{OH})]$$

RAF:



$$\Delta G = G([\text{ANTI-OH}]\bullet) - [G(\text{ANTI}) + G(\bullet\text{OH})]$$

ANTI son las moléculas antioxidantes estudiadas, ANTI-H_(HAT)• representa las moléculas deshidrogenadas mientras que [ANTI-OH]• representa los aductos radicales.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.29 se muestran las tres estructuras posibles de los compuestos SIL-Cu(II) y SIL_(-H)-Cu(II). Se reportan las diferencias energéticas con respecto a la estructura más estable para los mecanismos de quelatación directa y de desprotonación-quelatación.

Las geometrías iniciales para el compuesto SIL-Cu(II) fueron aquellas donde SIL es un ligante bidentado, es decir las posiciones R₅-CO, R₃-CO y R₁₉-R₂₀. Dado que una de las formas más estables de coordinación del Cu(II) es tetracoordinada con geometría de cuadrado plano, las estructuras optimizadas de los sistemas SIL-Cu(II) presentan dos moléculas de agua.¹⁴³ La estructura más estable es la que forma el quelato con Cu(II) en la posición R₃-CO. La segunda más estable es la que también involucra al carbonilo de la SIL ($\Delta E = 4.8$ kcal/mol) en posición R₅-CO y finalmente la estructura menos estable es la que presenta el quelato en las posiciones R₁₉-R₂₀. ($\Delta E = 6.6$ kcal/mol). Todas las geometrías tienen dos de los tres puentes de hidrógeno intramoleculares.^{93,121} Dado que las diferencias energéticas son relativamente pequeñas (menores a 5 kcal/mol), podrían coexistir en condiciones experimentales.

Para el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación, la posición en la que se forma el quelato más estable es diferente. Esta estructura contiene al Cu(II) interaccionando con los oxígenos en posición R₅-CO de la SIL. Esta estructura ha sido experimentalmente descrita como la más estable.¹⁹⁵ Estos resultados corroboran los estudios de estabilidad y su relación con los puentes de hidrógeno intramoleculares reportados anteriormente.¹²¹ Las distancias de enlace O-Cu son más cortas en los sistemas SIL_(-H)-Cu(II) que en los sistemas SIL-Cu(II).

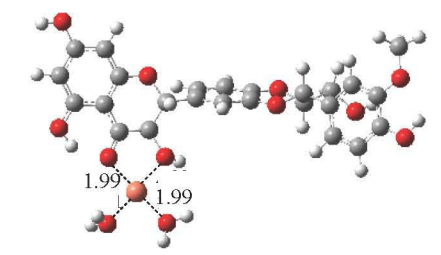
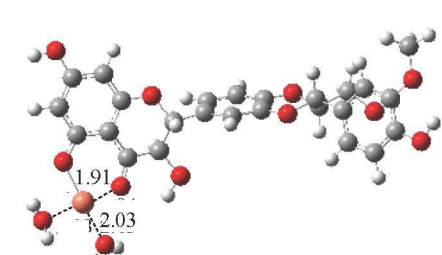
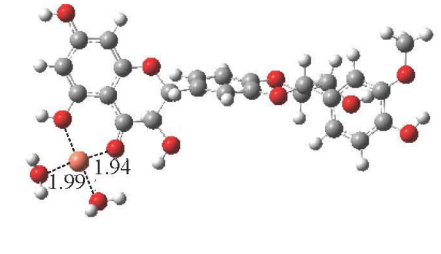
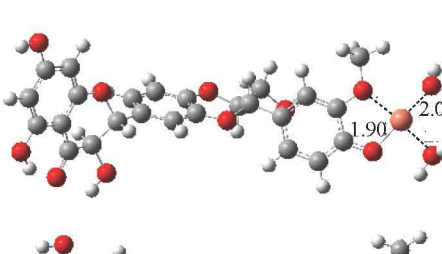
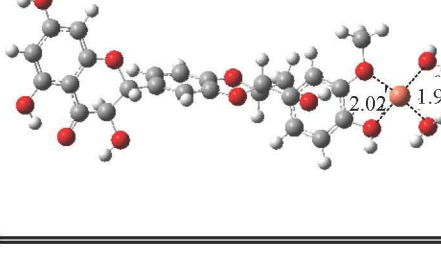
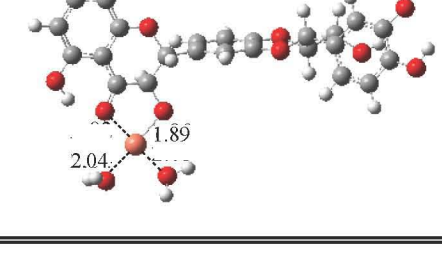
SIL-Cu(II)	ΔE (kcal/mol)	SIL _(-H) -Cu(II)	ΔE (kcal/mol)
	0.0		0.0
	4.8		5.9
	6.6		6.8

Figura 5.29. Geometrías optimizadas para el compuesto SIL-Cu(II) y SIL_(-H)-Cu(II) analizando el mecanismo de quelatación directo y el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación. Para los compuestos SIL-Cu(II) la carga global de los sistemas es +2, mientras que para los compuestos SIL_(-H)-Cu(II) la carga global de los sistemas es +1. Se presentan también las energías relativas (ΔE en kcal/mol) con respecto al compuesto más estable.

La Figura 5.30 reporta las estructuras optimizadas más estables para la interacción de Cu(I) con SIL tomando en cuenta el mecanismo directo y el acoplado. Se obtuvieron cuatro estructuras posibles correspondientes a los sistemas SIL-Cu(I) y SIL_(-H)-Cu(I). En todos los casos la SIL actúa como un ligante monodentado y hay sólo una molécula de agua coordinada al Cu(I), ya que se ha reportado que estas son las geometrías más estables.

Para los dos mecanismos, todas las estructuras presentan una estabilidad similar, y se puede suponer que en condiciones experimentales todas puedan coexistir. En el mecanismo acoplado primero ocurre la desprotonación y en ese mismo lugar la quelatación. La estructura más estable contiene el átomo de Cu enlazado al átomo de oxígeno en posición R₇. El hidrógeno más ácido de la SIL se encuentra en posición R₇, por lo que la

desprotonación en ese sitio de la molécula se encuentra más favorecido. Cabe mencionar que el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación con Cu(II) al analizar la estructura con el metal interaccionando con el oxígeno en posición R₇ no es estable pues la SIL no puede formar un quelato en esta posición.

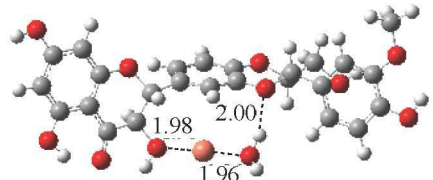
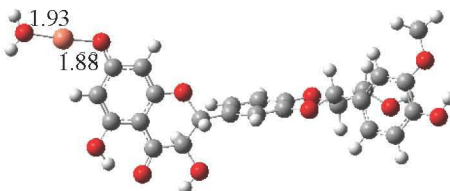
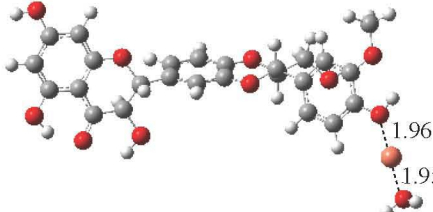
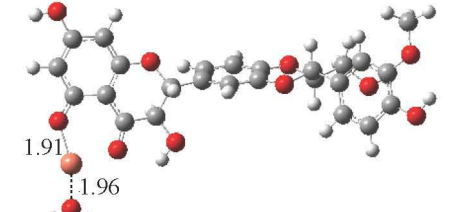
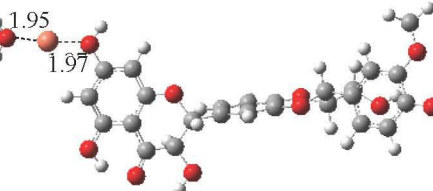
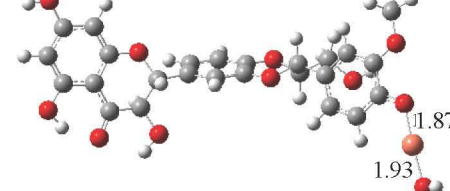
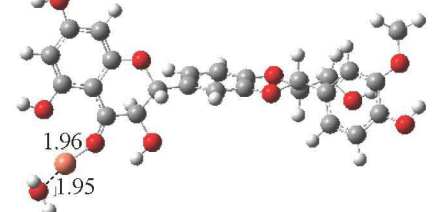
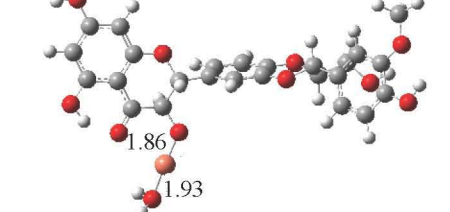
SIL-Cu(I)	ΔE (kcal/mol)	SIL _(-H) -Cu(I)	ΔE (kcal/mol)
	0.0		0.0
	5.2		4.3
	6.3		4.3
	6.9		9.0

Figura 5.30. Geometrías optimizadas para el compuesto SIL-Cu(I) y SIL_(-H)-Cu(I) analizando los mecanismos directo y acoplado. La carga global de los sistemas es +1 y 0, y sólo hay una molécula de agua coordinada a los átomos de Cu. Se incluyen las energías relativas (ΔE en kcal/mol) con respecto al compuesto más estable.

En la Figura 5.31 se reportan las estructuras optimizadas de la ASTA con Cu(I) y Cu(II) estudiando los dos mecanismos propuestos: la quelatación directa y la desprotonación seguida de la quelatación. En todos los casos, la especie con Cu(II) es tetracoordinada y la

que contiene Cu(I) es bicoordinada. El sistema ASTA-Cu(II) considerando a la molécula como un ligante bidentado ya había sido reportado. En este estudio se volvió a optimizar para poder llevar a cabo las comparaciones correspondientes.⁹⁶ Para estudiar los sistemas $ASTA_{(-H)}$ -Cu(II) y $ASTA_{(-H)}$ -Cu(I) se desprotonó el hidrógeno del grupo –OH en posición orto a la cetona. En general, las distancias de enlace para los sistema con Cu(I) son ligeramente más cortas que para aquellos con Cu(II) y cuando ASTA se encuentra desprotonada son ligeramente más cortas que cuando no lo está.

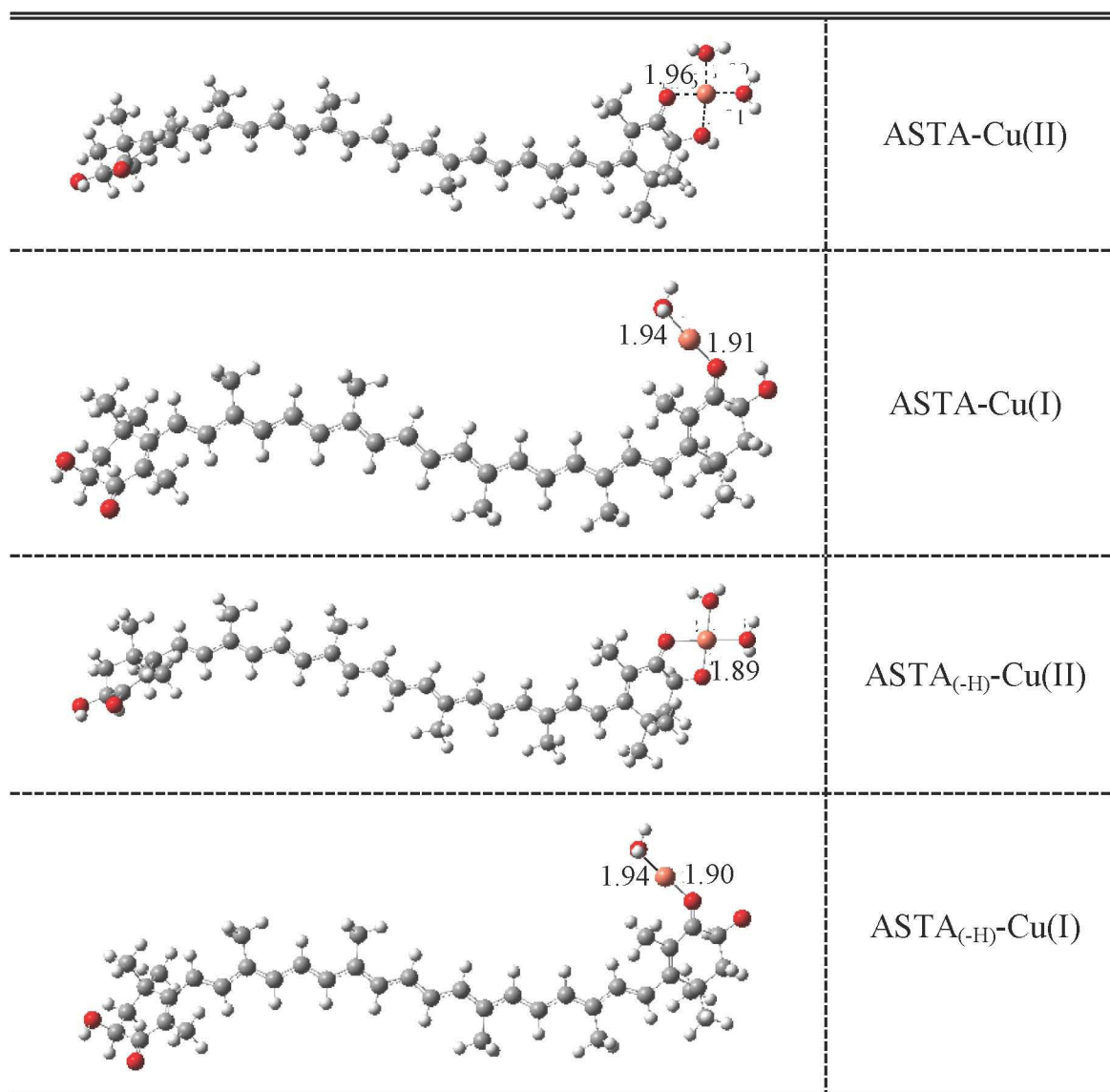


Figura 5.31. Geometrías optimizadas de ASTA y ASTA desprotonada ($ASTA_{(-H)}$) interactuando con Cu(II) y Cu(I).

La Figura 5.32 reporta las estructuras optimizadas de MELA y 3OHM interactuando con Cu(II) y Cu(I). Estas estructuras fueron optimizadas y reportadas previamente como las más estables.¹⁴³ Por una cuestión de consistencia en las comparaciones, se volvieron a optimizar con la misma metodología que las demás. Los resultados que aquí se reportan son similares a los publicados previamente.

En la Tabla 5.5 se reportan las energías libres de Gibbs, ΔG (kcal/mol) asociadas con el mecanismo de quelatación directa para Cu(II) y Cu(I). Sólo las estructuras más estables fueron consideradas para este estudio, y algunos valores ya reportados se muestran entre paréntesis. Al comparar con estudios previos, se observa que los resultados son similares si se utiliza otra metodología. Analizando las reacciones de quelatación directa con Cu(II), todos los valores son negativos y por lo tanto son reacciones exergónicas. Los valores para las reacciones con ASTA y 3OHM son más negativos que con SIL y MELA, y por lo tanto estas moléculas son mejores atrapadores de Cu(II). Para las reacciones de quelatación directa con Cu(I), las reacciones para MELA y 3OHM son exergónicas, mientras que para SIL el valor de ΔG es muy pequeño y para ASTA el valor de ΔG es positivo. Con base en estos resultados se puede decir que las mejores moléculas quelatantes son MELA y 3OHM. En resumen, SIL y ASTA son buenos quelatantes de Cu(II) pero no de Cu(I), mientras que MELA y 3OHM son buenos quelatantes de ambas especies, (Cu(II) y Cu(I)).

Las energías libres de Gibbs para el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación se muestran en la Tabla 5.6. Los valores teóricos de MELA y 3OHM fueron reportados previamente utilizando otra metodología y se incluyen entre paréntesis. Esos resultados son similares a los que se obtuvieron con la metodología propuesta en este trabajo. El primer resultado evidente es que todos los valores de las reacciones con Cu(I) son positivos, lo que quiere decir que las reacciones son endergónicas y entonces no están favorecidas termodinámicamente. Por otro lado, las reacciones con Cu(II) son exergónicas con la excepción de aquella cuyo reactivo es MELA. Los valores reportados en la Tabla 5.6 indican que las moléculas 3OHM y SIL son mejores *atraperadoras* de Cu(II) que ASTA para este mecanismo, y MELA es incapaz de quelatar al Cu, pues en los dos casos los valores asociados a las reacciones son positivos.

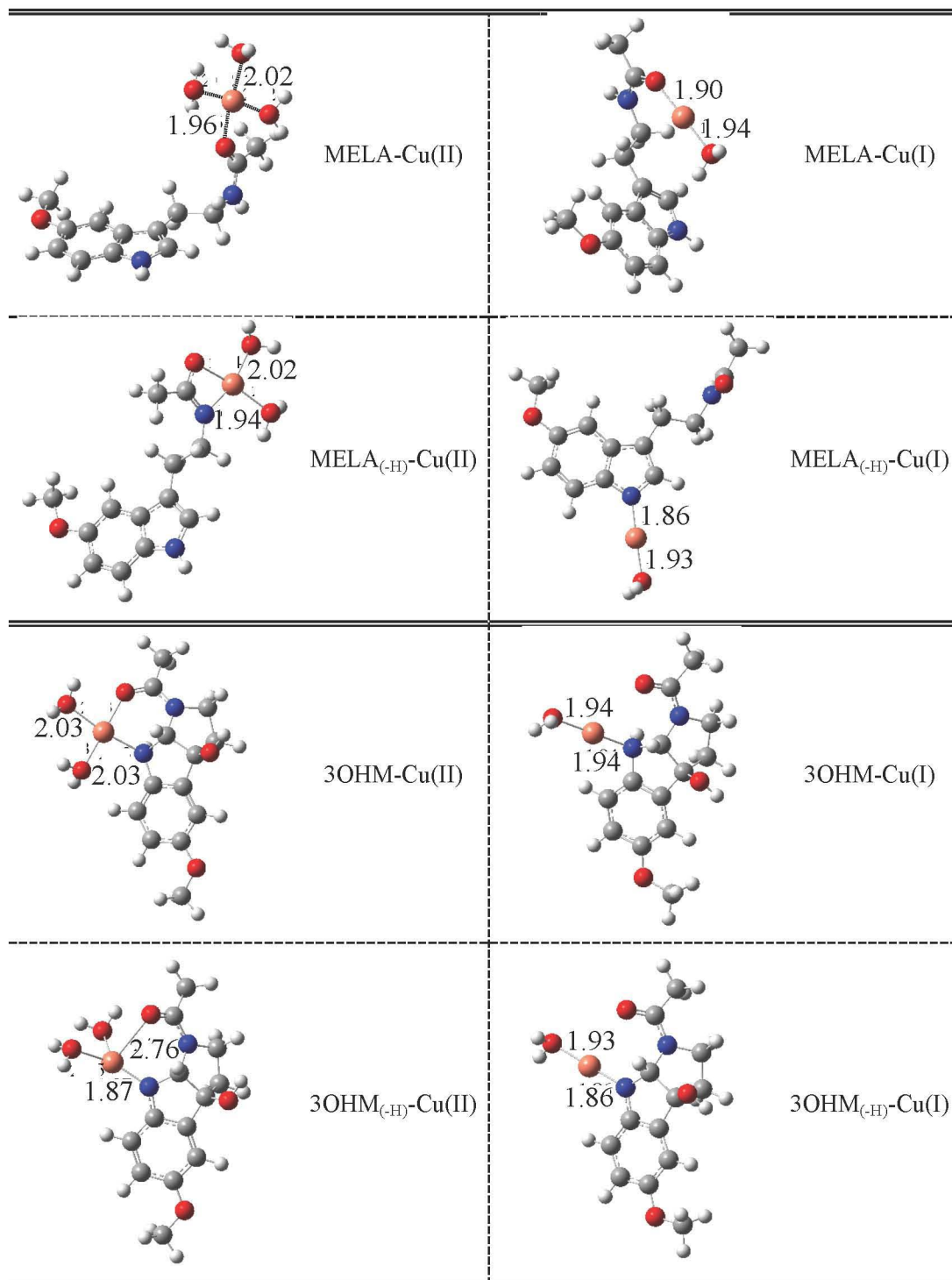


Figura 5.32. Estructuras optimizadas para las moléculas antioxidantes MELA y 3OHM interaccionando con Cu(II) y Cu(I) al analizar los dos mecanismos de quelatación.

Tabla 5.5. Valores de ΔG (Energías libres de Gibbs de reacción en kcal/mol a 298 K) para el mecanismo directo de quelatación. Los valores entre paréntesis están reportados en la referencia 143.

SIL-Cu(II) -8.15	SIL-Cu(I) -0.59
ASTA-Cu(II) -10.35	ASTA-Cu(I) 0.51
MELA-Cu(II) -4.04 (-2.49)	MELA-Cu(I) -2.31 (-3.64)
3OHM-Cu(II) -12.52 (-7.06)	3OHM-Cu(I) -6.41 (-5.18)

Tabla 5.6. Valores de ΔG (Energías libres de Gibbs de reacción en kcal/mol a 298 K) para el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación. Los valores entre paréntesis están reportados en la referencia 143.

SIL _(-H) -Cu(II) -13.61	SIL _(-H) -Cu(I) 3.71
ASTA _(-H) -Cu(II) -8.06	ASTA _(-H) -Cu(I) 29.56
MELA _(-H) -Cu(II) 2.76 (8.22)	MELA _(-H) -Cu(I) 10.31 (11.28)
3OHM _(-H) -Cu(II) -12.03 (-13.39)	3OHM _(-H) -Cu(I) 12.24 (12.59)

Los resultados de las Tablas 5.5 y 5.6 muestran que el mecanismo acoplado de desprotonación-quelatación es el principal para la SIL, pero no para ASTA, 3OHM y MELA. Para ASTA, el mecanismo que presenta la reacción más exergónica es el de quelatación directa. 3OHM presenta valores de las energías libres de Gibbs similares considerando ambos mecanismos para Cu(II) pero no para Cu(I). Las reacciones con MELA son exergónicas para el mecanismo directo y endergónicas para el acoplado. El análisis para Cu(I) resulta claro pues SIL y ASTA presentan reacciones endergónicas,

mientras que MELA y 3OHM lo pueden atrapar vía el mecanismo directo. En resumen y considerando ambos mecanismos para atrapar Cu, se puede decir que SIL, ASTA y 3OHM son mejores ligantes para quelatar Cu que MELA.

Una vez analizada la posibilidad de enlazarse con Cu(II) y Cu(I) es necesario investigar qué sucede con estas mismas moléculas y su capacidad para atrapar el radical libre $\bullet\text{OH}$. Las Tablas 5.7 y 5.8 reportan las energías libres de Gibbs para las reacciones correspondientes a los mecanismos HAT y RAF, respectivamente. Los resultados que se presentan entre paréntesis corresponden a valores previamente reportados. Como se podía esperar todas las reacciones con el radical libre $\bullet\text{OH}$ son exergónicas para los dos mecanismos estudiados. Los valores de las energías libres de Gibbs indican que las reacciones con MELA y 3OHM son más exergónicas que aquellas con SIL y ASTA. En todos los casos, el mecanismo HAT se encuentra termodinámicamente más favorecido que el RAF (valores más negativos).

Tabla 5.7. Valores de ΔG (energías libres de Gibbs de reacción en kcal/mol a 298 K) para el mecanismo HAT. Los valores entre paréntesis están reportados en las referencias 39 y 142.

	SIL	ASTA	MELA	3OHM
$\bullet\text{OH}$	-22.14	-27.77	-36.22 (-31.40)	-45.26 (-35.76)

Tabla 5.8. Valores de ΔG (energías libres de Gibbs de reacción en kcal/mol a 298 K) para el mecanismo RAF. Los valores entre paréntesis están reportados en las referencias 39, 47 y 142.

	SIL	ASTA	MELA	3OHM
$\bullet\text{OH}$	-10.56	-15.16 (-32.43)	-23.97 (-25.7)	-20.73 (-19.11)

Las moléculas pueden quelatar los iones de Cu o atrapar radicales libres, y para discernir cuál de los procesos se va a llevar a cabo preferentemente con base en la termodinámica, se

compararon los resultados de las Tablas 5.5 a 5.8. Con cada molécula se seleccionó el resultado de la reacción más exergónica para determinar cuál es el mecanismo principal. Se asume que la concentración de radicales libres y de cobre es la misma y que las moléculas antioxidantes pueden reaccionar con todas las especies: Cu(I), Cu(II) y •OH.

Para la molécula de SIL el mecanismo principal para quelatar Cu es el acoplado desprotonación-quelatación con un valor de ΔG igual a -13.61 kcal/mol. El mecanismo principal para atrapar radicales libres es el HAT con un valor de la energía libre de Gibbs igual a -22.14 kcal/mol. Esto quiere decir que en presencia de ambos reactivos (Cu(II) y •OH), la SIL va a actuar preferentemente atrapando el radical libre •OH. Este mismo análisis es válido para la molécula de ASTA. Al quelatar Cu(II), el mecanismo de quelatación directa se compara con el mecanismo principal para atrapar radicales libres (HAT). Con base en esta comparación se puede concluir que la molécula ASTA reaccionará principalmente con el •OH. MELA quelata el Cu(II) a través de una reacción exergónica mediante el mecanismo de quelatación directa, pero el valor de ΔG es nueve veces más pequeño comparado con el valor de ΔG del mecanismo de HAT con el radical libre •OH. Esta misma conclusión se obtiene al analizar los valores de las energías libres de Gibbs para las reacciones con la molécula 3OHM. Esto significa que la 3OHM va a reaccionar preferentemente con el •OH. El radical libre •OH es uno de los más reactivos y se puede esperar que su cinética sea mucho mayor comparada con la de los mecanismos de quelatación, por lo que resultaría todavía menos favorable atrapar iones de Cu en presencia de este radical libre.²⁰³

De este estudio comparativo se puede concluir que ninguna de las moléculas estudiadas quelata o se enlaza a Cu preferentemente en presencia del radical libre •OH.

- CONCLUSIONES

La reacción de SIL con Cu(II) más favorable corresponde al mecanismo de desprotonación-quelatación, mientras que para Cu(I) únicamente el mecanismo de quelatación directa está favorecido termodinámicamente.

La SIL es mejor que MELA y peor que ASTA y 3OHM para el mecanismo de quelatación directa de Cu, pero es la molécula que mejor atrapa Cu(II) bajo el mecanismo acoplado. La SIL atrapa el radical libre $\bullet\text{OH}$ mediante los mecanismos RAF y HAT, pero la reacción no está tan favorecida como con MELA, 3OHM y ASTA.

Los valores de ΔG sugieren que, en presencia de concentraciones equivalentes de Cu y $\bullet\text{OH}$, la reacción con $\bullet\text{OH}$ está más favorecida termodinámicamente. SIL, MELA, 3OHM y ASTA reaccionaran como *atrapadores* de radicales libres, imposibilitando su quelatación con Cu y limitando su reactividad como *atrapadores* de Cu.

Ninguna de las moléculas analizadas podría quelatar Cu en presencia del radical libre $\bullet\text{OH}$.^{3*}

^{3*} Los resultados de esta sección se encuentran en el artículo publicado bajo el título *Copper or free radical scavenger?* por los autores Ana Martínez y Miguel Reina en la revista *Computational and Theoretical Chemistry*, volumen 1104, páginas 1-11 en el año 2017.

6. CONCLUSIONES

- ❖ De acuerdo con los resultados obtenidos para el estudio de reactividad de los componentes principales de silimarina, no hay un componente que destaque por encima de los demás en cuanto a su capacidad para atrapar radicales libres a pH fisiológico. Esto quiere decir que la mezcla de silimarina es un potente antioxidante por todos los compuestos que hay en ella.
- ❖ La presencia de átomos y cúmulos metálicos modifica los espectros Raman de la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, aumentando la intensidad de las señales y generando nuevas.
- ❖ La presencia de metales incrementa la capacidad para donar y aceptar un electrón de la SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Los sistemas con metales son mejores donadores y mejores aceptores de electrones que las moléculas SIL y $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, por lo que su capacidad antioxidante se incrementa.
- ❖ Los sistemas con metales son mejores antioxidantes que la SIL y la $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ según mecanismos RAF y HAT.
- ❖ Los productos más estables de los mecanismos RAF y HAT son mejores donadores de electrones que las moléculas orgánicas sin cúmulos metálicos. Los sistemas estudiados, una vez deshidrogenados o enlazados a un radical libre pueden todavía estabilizar radicales libres mediante el mecanismo SET.
- ❖ Los valores de ΔG sugieren que, en presencia de concentraciones equivalentes de Cu y $\bullet\text{OH}$, la reacción con $\bullet\text{OH}$ está más favorecida termodinámicamente. SIL, MELA, 3OHM y ASTA reaccionaran como *atrapadores* de radicales libres, imposibilitando su quelatación con Cu y limitando su reactividad como *atrapadores* de Cu.

7. PERSPECTIVAS

La química de los radicales libres y las formas de estabilizar estas moléculas son variadas; en ese sentido, las posibilidades a futuro de este trabajo de tesis pueden ser muy amplias. En este apartado, se presentan sólo alguno de los proyectos que pueden desarrollarse teniendo en cuenta los trabajos aquí presentados se enlistan a continuación:

- ❖ Analizar la capacidad antioxidante de la melatonina y tres de sus metabolitos: *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-methoxikinuramina (AFMK), *N*¹-acetil-5-methoxikinuramina (AMK) y ciclo 3-hidroximelatonina (3OHM), en términos de su capacidad para deshidrogenarse y atrapar más de un radical libre mediante la sucesión de los diversos mecanismos de reactividad estudiados.^{4*}

- ❖ Investigar la capacidad antioxidante de cúmulos metálicos de Cu, Ag y Au de dos a diez átomos mediante el mecanismo de RAF proponiendo un mecanismo sistemático para llevar a cabo la adición de los radicales libres en los cúmulos,^{5*} e indagar la capacidad de estos sistemas para atrapar más de un radical libre.

^{4*} Los resultados de este proyecto titulado *A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites* por los autores Miguel Reina y Ana Martínez se encuentran sometidos en la revista *Computational and Theoretical Chemistry*.

^{5*} Los resultados de esta sección se encuentran en el artículo publicado bajo el título *Free radicals interacting with Cu, Ag and Au clusters* por los autores Miguel Reina y Ana Martínez en la revista *Computational and Theoretical Chemistry*, volumen 1120, páginas 24-33 en el año 2017.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Galano, A. Free radicals induced oxidative stress at a molecular level: the current status, challenges and perspectives of computational chemistry based protocols. *J. Mex. Chem. Soc.* **2015**, *59(4)*, 231-262.
- 2.- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Review. Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47–95.
- 3.- Genestra, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 1807-1819.
- 4.- Yin, H.; Zhu, M. Free radical oxidation of cardiolipin: chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free Radic. Res.* **2012**, *46*, 959-974.
- 5.- Pham-Huy, L.A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, *4*, 89-96.
- 6.- Halliwell, B. Free radicals and other reactive species in disease. *eLS.* **2015**, 1-9.
- 7.- Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1-40.
- 8.- Inoue, M.; Sato, E. F.; Nishikawa, M.; Park, A. M.; Kira, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2495-2505.
- 9.- Shiraiwa, M.; Selzle, K.; Pöschl, U. Hazardous components and health effects of atmospheric aerosol particles: reactive oxygen species, soot, polycyclic aromatic compounds and allergenic proteins. *Free Radic. Res.* **2012**, *46*, 927-939.
- 10.- Valencia-Islas, N.; Zambrano, A.; Rojas, J. L. Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 1619-1634.
- 11.- Aleryani, S. L.; Aleryani, R. A.; Al-Akwa, A.A. Khat a drug of abuse: roles of free radicals and antioxidants. *Drug Test Anal.* **2011**, *3*, 548-551.
- 12.- Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc. Nutr. Soc.* **2006**, *65*, 278-290.

- 13.- Carocho, M.; Ferreira, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies an future perspectives. *Food and Chemical Toxicol.* **2013**, *51*, 15-25.
- 14.- Pryor, W. A. Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: It has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radical Bio. Med.* **1988**, *4*, 219-223.
- 15.- Vijayalaxmi; Reiter R.J.; Tan D.X.; Herman T.S.; Thomas C.R. Jr. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2004**, *59(3)*, 639–653.
- 16.- Chatgililoglu, C.; D'Angelantonio, M.; Guerra, M.; Kaloudis, P.; Mulazzani, Q. G. A reevaluation of the ambident reactivity of the guanine moiety towards hydroxyl radicals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 2214-2217.
- 17.- Pryor W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **1986**, *48*, 657–667.
- 18.- Weinstein, J.; Bielski, B. H. J. Kinetics of the interaction of HO₂ and O₂⁻ radicals with hydrogen peroxide. The Haber-Weiss reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 58–62.
- 19.- Arouma, O. I.; Halliwell, B.; Gajewski, E.; Dizdaroglu, M. Copper-ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **1991**, *273*, 601-604.
- 20.- Letelier, M. E.; Sánchez-Jofréz, S.; Peredo-Silva, L.; Cortés-Troncoso, J.; Aracena-Parks, P. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *188*, 220-227.
- 21.- Barceloux, D. G. Copper. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1999**, *37*, 217–237.
- 22.- Linder, M. C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 965S–971S.
- 23.- Gaetke, L. M.; Chow, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicol.* **2003**, *189*, 147–163.
- 24.- Gerschman, R.; Gilbert, D. L.; Nye, S. W.; Dwyer, P.; Fenn, W.O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* **1954**, *119*, 623-626.
- 25.- Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1147-1150.
- 26.- Tran, T. D.; Thi-Thao-Nhu, N.; Ha-Tuong, D.; Thi-Ngoc-Phuong, H.; Cat-Dong, T.; Khac-Minh, T. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic chalcone analogues alone and in combination with antibiotics. *Molecules* **2012**, *17*, 6684-6696.

- 27.- Lacka, I.; Konieczny, M. T.; Bulakowska, A.; Rzymowski, T.; Milewski, S. Antifungal action of the oxathiolone-fused chalcone derivative. *Mycoses* **2011**, *54*, E407–E414.
- 28.- Kontogiorgis, C.; Mantzanidou, M.; Hadjipavlou-Litina, D. Chalcones and their potential role in inflammation. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1224–1242.
- 29.- Bandgar, B. P.; Gawande, S. S.; Bodade, R. G.; Totre, J. V.; Khobragade, C. N. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1364–1370.
- 30.- Shenvi, S.; Kumar, K.; Hatti, K. S.; Rijesh, K.; Diwakar, L.; Reddy, G. C. Synthesis, anticancer and antioxidant activities of 2,4,5-trimethoxy chalcones and analogues from asaronaldehyde: Structure activity relationship. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 435–442.
- 31.- Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* **2000**, *66*, 663–673.
- 32.- Pervaiz, S.; Holme, A. L. Resveratrol: Its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2851–2897.
- 33.- Gupta, J. K.; Sharma, P. K.; Dudhe, R.; Chaudhary, A.; Singh, A.; Verma, P. K.; Mondal, S. C.; Yadav, R. K.; Kashyap, S. Analgesic study of novel pyrimidine derivatives linked with coumarin moiety. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1625–1632.
- 34.- Maitland-van der Zee, A. H.; Daly, A. K.; Kamali, F.; Manolopoulos, V. G.; Verhoef, T. I.; Wadelius, M.; de Boer, A.; Pirmohamed, M.; Grp, E.-P. S. Patients benefit from genetics-guided coumarin anticoagulant therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2014**, *96*, 15–17.
- 35.- Belluti, F.; Fontana, G.; Dal Bo, L.; Carenini, N.; Giommarelli, C.; Zunino, F. Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3543–3550.
- 36.- Fylaktakidou, K. C.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Litinas, K. E.; Nicolaides, D. N. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3813–3833.
- 37.- León-Carmona, J. R.; Alvarez-Idavoy, J.R.; Galano, A. On the peroxy scavenging activity of hydroxycinnamic acid derivatives: mechanisms, kinetics, and importance of the acid–base equilibrium. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12534.
- 38.- Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on electron-transfer reactions between carotenoids and free radicals. *J. Phys. Chem B* **2009**, *113*, 12113–12120.
- 39.- Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. Theoretical study on the chemical fate of adducts formed through free radical addition reactions to carotenoids. *Theo. Chem. Acc.* **2010**, *127*, 595–603.

- 40.- Sies, H.; Stahl, W.; Sundquist, A. R. Antioxidant functions of vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1992**, *669*, 7-20.
- 41.- Ames, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **1983**, *221*, 1256–1264.
- 42.- Hyuncheol, O.; Do-Hoon, K.; Jung-Hee, C.; Youn-Chul, K. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 421-424.
- 43.- Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Inver. Aging.* **2007**, *2*, 219-236.
- 44.- Steenvoorden, D. P. T.; Henegouwen, G. M. J. B. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection against oxidant-induced damage. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *41*, 1-10.
- 45.- Palace, V. P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 746-761.
- 46.- Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Hardeland, R.; López-Burillo, S.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; Reiter, R.J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.* **2003**, *34*, 75-78.
- 47.- 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.
- 48.- Senter, S.D.; Horvat, R.J.; Forbus, W.R. Comparative GLC-MS analysis of phenolic acids of selected tree nuts. *J. Food. Sci.* **1983**, *48*, 798-799.
- 49.- De Beer, D.; Joubert, E.; Gelderblom, W.C.; Manley, M. Antioxidant activity of south african red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 902-909.
- 50.- Galano, A.; Mazzone, G.; Álvarez-Diduk, R.; Marino, T.; Álvarez-Idaboy, J.R.; Russo, N. Food antioxidants: chemical insights at the molecular level. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2016**, *7*, 335–52
- 51.- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plants Science* **1997**, *2*, 152-159.
- 52.- Martínez, A. Donator acceptor map of psittacofulvins and anthocyanins: are they good antioxidant substances? *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4915-4921.
- 53.- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572-584.

- 54.- López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *763*, 1-10.
- 55.- Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 3232-3237.
- 56.- Weight, J.S.; Johnson, E.R.; DiLabio, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects and applications to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173-1183.
- 57.- Zhang, H.Y.; Sun, Y.M.; Wang, X.L. Substituents effects on OH bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in that rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure-reactivity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem. A Eur. J.* **2003**, *9*, 502-508.
- 58.- Leopoldini, M.; Pitarch, I.P.; Russo, N.; Toscano, M. Structure conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principal theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 92-96
- 59.- Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *111*, 210-216.
- 60.- Avelar, M.; Martínez, A. Do Casiopeínas® prevent cancer disease by acting as antiradicals? A chemical reactivity study applying density functional theory. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 250-256.
- 61.- Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586-621.
- 62.- Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zieliski, T.; Soffers, A.E.M.; Rietjens, I.M.C. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxylflavones. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *31*, 869-881.
- 63.- Ortega-Moo, C.; Garza, J.; Vargas, R. The substituent effect on the antioxidant capacity of catechols and resorcinols. *Theor. Chem. Acc.* **2016**, 135:177.
- 64.- Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- 65.- Biedermann, D.; Vavrikova, E.; Cvak, L.; Kren, V. Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1077-1232.
- 66.- Herrmann, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *Intl. J. of Food Science & Technol.* **1976**, *11*, 433-448.

- 67.- Orhan, D.D.; Ozcelik, B.; Ozgen, S.; Ergun, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* **2010**, *165*, 496-504.
- 68.- Lobo, V.; Patil, A.; Pathak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional food. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 118-126.
- 69.- Yan, M. H.; Wang, X.; Zhu, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *62*, 90–101.
- 70.- Butterfield, D. A. β -Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem. Res. Tox.* **1997**, *10*, 495-506.
- 71.- Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **2001**, *18*, 685–716.
- 72.- Ballinger, S.W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1278-1295.
- 73.- Uchino, Y.; Kawakita, T.; Ishii, T.; Ishii, N.; Tsubota, K. A new mouse model of dry eye disease: oxidative stress affects functional decline in the lacrimal gland. *Cornea* **2012**, *31*, S63-S67.
- 74.- Araujo, A. M.; Reis, E. A. G.; Athanazio, D. A.; Ribeiro, G. S.; Hagan, J. E.; Araujo, G. C.; Damiao, A. O.; Couto, N. S.; Ko, A. I.; Noronha-Dutra, A.; Reis, M. G. Oxidative stress markers correlate with renal dysfunction and thrombocytopenia in severe leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 719-723.
- 75.- Shadab, M.; Agrawal, D.K.; Adams, M.; Islam, N.; Ahmad, Z. Occupational health hazards among sewage workers: oxidative stress and deranged lung functions. *J. Clin. Diagnostic Res.* **2014**, *8*, BC11-BC13.
- 76.- Tesfamariam, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 383-391.
- 77.- Pace, G. W.; Leaf, C. D. The role of the oxidative stress in HIV disease. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 523-528.
- 78.- Babbs, C. F. Free radicals and the ethiology of colon cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8*, 191-200.
- 79.- MacNee, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *429*, 195-207.
- 80.- Myatt, L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.* **2006**, *572*, 25-30.

- 81.- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Cronin, M.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- 82.- Bahorun, T.; Soobratte, M. A.; Luximon-Ramma, V.; Aruoma, O. I. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *J. Med. Update* **2006**, *1*, 1-17.
- 83.- Sayre, L. M.; Perry, G.; Smith, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 172-188.
- 84.- Litwinienko, G.; Ingold, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) in alcohols. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3433-3438.
- 85.- Markovic, Z.S.; Markovic, S.; Markovic, J.M.D.; Milenkovic, D. Structure and reactivity of baicalein radical cation. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 2009-2017
- 86.- Estévez, L.; Otero, N.; Mosquera, R. A. A Computational Study on the Acidity Dependence of Radical-Scavenging Mechanisms of Anthocyanidins. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9706-9712.
- 87.- Foti, M. C. Antioxidant properties of phenols. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 1673-1685.
- 88.- Iuga, C.; Alvarez-Idaboy, J. R.; Russo, N. Antioxidant activity of *trans*-resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: A quantum chemical and computational kinetics study. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3868-3877.
- 89.- Galano, A.; Álvarez-Diduk, R.; Ramirez-Silva, M.T.; Alarcón-Ángeles, G.; Rojas-Hernández, A. Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chem. Phys.* **2009**, *363*, 13-23.
- 90.- Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M.A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 9037-9042.
- 91.- Galano, A.; Martínez, A. Capsaicin, a tasty free radical scavenger: mechanism of action and kinetics. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 1200-1208.
- 92.- Mazzone, G.; Toscano, M.; Russo, N. Density functional predictions of antioxidant activity and UV spectral features of nasutin A, isonasutin, ellagic acid, and one of its possible derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 9650-9657.
- 93.- Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gazak, R.; Hrbáč, J.; Sedmera, P.; Kren, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.L.; et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1054-1063.

- 94.- Cao, L.; Yu, H.; Shao S.; Wang, S.; Guo, Y. Evaluating the antioxidant capacity of polyphenols with an off-on fluorescence probe and the mechanism study. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7149-7153.
- 95.- Mortensen, A.; Skibsted, L.H.; Sampson, J.; Rice-Evans, C.; Everett, S.A. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 91-97.
- 96.- E. Hernández-Marín, E.; Barbosa, A.; Martínez, A. The metal cation chelating capacity of astaxanthin. Does this have any influence on antiradical capacity? *Molecules* **2012**, *17*, 1039–1054
- 97.- Martínez, A. Astaxanthin interacting with metal clusters: free radical scavenger and photovoltaic materials. *Theor. Chem. Acc.* **2016**, *135(5)*, 130-145.
- 98.- Reina, M.; Martínez, A. Silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans as free radical scavengers. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 11597-11606.
- 99.- Morazzoni, P.; Bombardelli, E. Silybum marianum (Carduus marianus). *Fitoterapia* **1995**, *LXVI*, 3-42.
- 100.- Simanek, V.; Kren, V.; Ulrichova, J.; Vicar, J.; Cvak, L. Silymarin: what is in the name...? An appeal for a change of editorial policy. *Hepathology* **2000**, *32*, 442-444.
- 101.- Milić, N.; Millosević, N.; Suvajdžić, L.; Zarkov, M.; Abenavoli, L. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1801-1810.
- 102.- Saller, R.; Meier, R.; Brignoli, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **2001**, *61*, 2035-2063.
- 103.- Wellington, K.; Jarvis, B. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* **2001**, *15*, 465-489.
- 104.- Abenavoli, L.; Capasso, R.; Milić, N.; Capasso, F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 1423-1432.
- 105.- Balian, S.; Ahmad, S.; Zafar, R. Antiinflammatory activity of leaf and leaf callus of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. in albino rats. *Indian J. Pharmacology* **2006**, *38*, 213-214.
- 106.- Agarwal, R.; Agarwal, C.; Ichikawa, H.; Singh, R.P.; Aggarwal, B.H. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Antican. Res.* **2006**, *26*, 4457-4498.
- 107.- Katiyar, S.K. Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 169.
- 108.- Deep, G.; Agarwal, R. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integr. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 130-145.

- 109.- Rajnochová Svobodová, A.; Zálešák, B.; Biedermann, D.; Ulrichová, J.; Vostálová J. Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *J. of Photochem. Photobiol. B: Biology* **2016**, *156*, 61-68.
- 110.- Wagner, H.; Hörhammer, L.; Münster, R. On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum*(L) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneimittelforschung* **1968**, *18*, 688-696.
- 111.- Schuppan, D.; Jia, J.D.; Brinkhaus, B.; Hahn, E.G. Herbal products for liver diseases: A therapeutic challenge for the new millennium. *Hepatology* **1999**, *30*, 1099-1104.
- 112.- Surai, P.F. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants* **2015**, *4*, 204-247.
- 113.- Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.
- 114.- Comelli, M.C.; Mengs, U.; Schneider, C.; Prosdociami, M. Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy. *Integr. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 120-129.
- 115.- Gažák, R.; Walterová, D.; Křen, V. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 315-338.
- 116.- Jain, A.; Dwivedi, N.; Bhargava, R.; Flora, S.J.S. Silymarin and naringenin protects nicotine induced oxidative stress in young rats. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2012**; *1*, 41-49.
- 117.- Wang, M.J.; Lin, W.W.; Chen, H.L.; Chang, Y.H.; Ou, H.C.; Kuo, J.S.; Hong, J.S.; Jeng, K.C.G. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur. J. Neurosci.* **2002**, *16*, 2103-2112.
- 118.- Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.* **2002**, *36*, 1199-1208.
- 119.- Loguercio, C.; Festi, D. Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 2288-2301.
- 120.- Mira, L.; Silva, M.; Manso, C.F. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 753-759.
- 121.- Gažák, R.; Svobodová, A.; Psotová, J.; Sedmera, P.; Prikrylová, V.; Walterová, D.; Křen, V. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5677-5687.

- 122.- van Wenum, E.; Jurczakowski, R.; Litwinienki, G. Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of the enol groups. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9102-9112.
- 123.- György, I.; Antus, S.; Blázovics, A.; Földiák, G. Substituent effects in the free radical reactions of silybin: radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH. *Int. J. Rad. Biol.* **1992**, *61*, 603-609.
- 124.- Fan, S.; Qi, M.; Yu, Y.; Li, L.; Yao, G.; Tashiro, S.; Onodera, S.; Ikejima, T. P53 activation plays a crucial role in silibinin induced ROS generation via PUMA and JNK. *Free Radic. Res.* **2012**, *46*, 310–319.
- 125.- Gharagozloo, M.; Khoshdel, Z.; Amirghofran, Z. The effect of an iron (III) chelator, silybin, on the proliferation and cell cycle of Jurkat cells: A comparison with desferrioxamine. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *589*, 1-7.
- 126.- Gallo, D.; Giacomelli, S.; Ferlini, C.; Raspaglio, G.; Apollonio, P.; Prislei, S.; Riva, A.; Morazzoni, P.; Bombardelli, E.; Scambia, G. Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex idB 1016, against human ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 2403-2410.
- 127.- Zeeshan, M.; Sliwka, H.R.; Partali, V.; Martínez, A. Electron uptake by classical electron donors: astaxanthin and carotenoid aldehydes. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 4522–4525
- 128.- Pang, S.F.; Allen, A.E. Extra-pineal melatonin in the retina: its regulation and physiological function. *Pineal Res. Rev.* **1986**, *4*, 55.
- 129.- Reiter, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol. Rev.* **1991**, *12*, 151-180
- 130.- Menéndez-Peláez A.; Reiter R.J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* **1993**, *15*, 59-69.
- 131.- Swarnakar, S.; Paul, S.; Singh L.P.; Reiter, R.J. Matrix metalloproteinases in health and disease. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 8–20.
- 132.- Motilva, V.; García-Mauriño, S.; Talero, E.; Illanes, M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 44–60.
- 133.-Tengattini, S.; Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Terron, M.P.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res.* **2008**, *44*, 16–25.
- 134.- Agorastos, A.; Huber, C.G. The role off melatonin in glaucoma: implications concerning pathophysiological relevance and therapeutic potential. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 1–7.

- 135.- Gitto, E.; Aversa, S.; Reiter, R.J.; Barberi, I.; Pelegrino, S. Update on the use of melatonin in pediatrics. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 21–28.
- 136.- Sánchez-Barceló, E.; Mediavilla, M.D.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Clinical uses of melatonin: evaluation of clinical trials. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2070–2095.
- 137.- Hardeland, R.; Madrid, J.A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 139–166.
- 138.- Rosen, J.; Than, N.N.; Koch, D.; Poeggeler, B.; Laatsch, H.; Hardeland, R. Interactions of melatonin and its metabolites with the ABTS cation radical: extension of the radical scavenger cascade and formation of a novel class of oxidation products, C2-substituted 3 indolinones. *J. Pineal Res.* **2006**, *41*, 374–381.
- 139.- Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Terron, M.P.; Flores, L.J.; Reiter, R.J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* **2007**, *42*, 28–42.
- 140.- Galano, A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 245–257.
- 141.- Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Qi, W.B.; Karbownik, M.; Calvo, J.R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signal Recep.* **2000**, *9*, 137–159.
- 142.- Galano, A.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxy radical scavenging activity of melatonin. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 5220–5228
- 143.- Galano, A.; Medina, M.E.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. *J. Pineal Res.* **2015**, *58*, 107–116.
- 145.- Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogenous electron gas. *Phys. Rev. B* **1964**, *136*, 864
- 146.- Kohn, W.; Sham, L.J. Self consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev. A* **1965**, *140*, 1133
- 147.- Zhao, Y.; Truhlar, D.G., The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- 148.- Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations - potentials for the transition-metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **82** (1985) 270–83.

- 149.- Sanader, Z.; Mitrić, R.; Bonačić-Koutecký, V.; Bellina, B.; Antoine, R.; Dugourd, P. The nature of electronic excitations at the metal-bioorganic interface illustrated on histidine-silver hybrids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *16*, 1257-1261.
- 150.- Katz, E.; Willner, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042-6108.
- 151.- Bonačić-Koutecký V.; Kulesza, A.; Gell, L.; Mitrić, R.; Bertorelle, A.F.; Hamouda, R.; Rayane, D.; Broyer, M.; Tabarin, T.; Dugourd P. Silver cluster biomolecule hybrids: from basics towards sensors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 9282-9290.
- 152.- Palmer, R.E.; Leung, C. Immobilisation of proteins by atomic clusters on surfaces. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 48-55.
- 153.- Shang, L.; Dong, S.; Nienhaus, G.U. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today* **2011**, *6*, 401-418.
- 154.- An, N.T.T.; Dao, D.Q.; Nam, P.C.; Huy, B.T.; Tran, H.N. Surface enhanced Raman scattering of melamine on silver substrate: An experimental and DFT study. *Spectrochimica Acta Part A: Mol and Biomol. Spectr.* **2016**, *169*, 230.
- 155.- Sharma, B.; Frontiera, R.R.; Henry, A.I.; Ringe E.; Van Duyne, R.P. SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today* **2012**, *15*, 16.
- 156.- Martínez A.; Romero, Y.; Castillo, T.; Mascaró, M.; López-Rull, I.; Simões, N.; Arcega-Cabrera, F.; Gaxiola, G.; Barbosa, A. The effect of copper on the color of shrimps: redder is not always healthier. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107673.
- 157.- Zatloukalová, M.; Křen, V.; Gažák, R.; Kubala, M.; Trouillas, P.; Ulrichová, J.; Vacek, J. Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu(II). *Bioelectrochem.* **2011**, *82*, 117-124.
- 158.- Borsari, M.; Gabbi, C.; Ghelfi, F.; Grandi, R.; Saladini, M.; Sverei, S.; Borella F. Silybin, a new iron-chelating agent. *J. Inor. Biochem.* **2001**, *85*, 123-129.
- 159.- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. Gaussian 09, Revision A.08 Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- 160.- Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193-218.
- 161.- Petersson, G. A.; Al-Laham, M.A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6081-6090.

- 162.- McLean, A. D.; Chandler, G. S. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 5639-5648.
- 163.- Raghavachari, K.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J.A. Self-Consistent molecular orbital methods. 20. Basis set for correlated wave-functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650-54.
- 164.- Matisz, G.; Kelterer, A. M.; Fabian, W. M. F.; Kunsági-Máté, S. Coordination of methanol clusters to benzene: a computational study. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 10556–10564.
- 165.- Meyer, M. M.; Kass, S. R. Experimental and theoretical gas phase acidities, bond dissociation energies, and heats of formation of HClO_x, x = 1–4. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 4086–4092.
- 166.- Paukku, Y.; Hill, G. Theoretical determination of one-electron redox potentials for DNA bases, base pairs, and stacks. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 4804–4810.
- 167.- Marvin 14.10.27, **2014**, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)
- 168.- 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.
- 169.- Vargas, R.; Martínez, A. Non-conventional hydrogen bonds: pterins-metal anions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 12775-12784.
- 170.- Martínez, A.; Vargas, R. Electron donor-acceptor properties of metal atoms interacting with pterins. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2988-2995.
- 171.- Reina, M.; Martínez, A. How the presence of metal atoms and clusters can modify the properties of Silybin? A computational prediction. *Comp. Theor. Chem.* **2017**, *1099*, 174-184.
- 172.-Sosa-Torres, M.E.; Saucedo-Vázquez, J.P.; Kroneck, P.M. "The dark side of dioxygen". In Kroneck, P.M.; Torres, M. E. Chapter 1, Section 3. In Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases. *Metal Ions in Life Sci.* **2015**, *15*, 1-12.
- 173.- Yang, S. K.; Xiao, L.; Li, J.; Liu, F.; Sun, L. Oxidative stress, a common molecular pathway for kidney disease: role of the redox enzyme p66Shc. *Renal Failure* **2014**, *36*, 313–320.
- 174.- Aruna, G.; Ambika Devi, K. Oxidative stress in chronic renal failure. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2014**, *5*, B127–B133.

- 175.- Ghasemzadeh, N.; Patel, R. S.; Eapen, D. J.; Veledar, E.; Kassem, H. A.; Manocha, P.; Khayata, M.; Zafari, A. M.; Sperling, L.; Jones, D.P.; Quyyumi, A. A. Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans. *Hypertension* **2014**, *63*, 1270–1275.
- 176.- Veselinovic, M.; Barudzic, N.; Vuletic, M.; Zivkovic, V.; Tomic-Lucic, A.; Djuric, D.; Jakovljevic, V. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: Relationship to disease activity. *Mol. Cell. Biochem.* **2014**, *391*, 225–232.
- 177.- Kundu, S.; Ghosh, P.; Datta, S.; Ghosh, A.; Chattopadhyay, S.; Chatterjee, M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Rad. Res.* **2012**, *46*, 1482–1489.
- 178.- Wang, J.; Li, J. Z.; Lu, A. X.; Zhang, K. F.; Li, B. J. Anticancer effect of salidroside on A549 lung cancer cells through inhibition of oxidative stress and Phospho-p38 expression. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1159–1164.
- 179.- Granados-Principal, S.; El-Azem, N.; Pamplona, R.; Ramirez-Tortosa, C.; Pulido-Moran, M.; Vera-Ramirez, L.; Quiles, J. L.; Sanchez-Rovira, P.; Naudí, A.; Portero-Otin, M.; Perez-Lopez, P.; Ramirez-Tortosa, M. Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *90*, 25–33.
- 180.- Pohanka, M. Alzheimer's Disease and oxidative stress: A review. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 356–364.
- 181.- Michail, K.; Baghdasarian, A.; Narwaley, M.; Aljuhani, N.; Siraki, A.G. Scavenging of free-radical metabolites of aniline xenobiotics and drugs by amino acid derivatives: toxicological implications of radical-transfer reactions. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1872–1883.
- 182.- Vejerano, E.; Lomnicki, S.; Dellinger, B. Lifetime of combustion-generated environmentally persistent free radicals on Zn(II)O and other transition metal oxides. *J. Environ. Monit.* **2012**, *14*, 2803–2806.
- 183.- Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an update review of their molecular mechanism and experimental models. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 323–331.
- 184.- Widsten, P.; Cruz, C.D.; Fletcher, G.C.; Pajak, M.A.; McGhie, T.K. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 11146–11156.

- 185.- Panchal, R.G.; Reid, S.P.; Tran, J.P.; Bergeron, A.A.; Wells J.; Kota, K.P.; Aman, J.; Bavari, S. Identification of an antioxidant small molecule with broad-spectrum antiviral activity. *Antivir. Res.* **2012**, *93*, 23–29.
- 186.- Danta, C.C.; Piplani, P. The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Drug Discov.* **2014**, *9*, 1205–1222.
- 187.- Tinkel, J.; Hassanain, H.; Khouri, S.J. Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms. *Cardiol. Rev.* **2012**, *20*, 77–83.
- 188.- Roleira, F.M.F.; Tavares-Da-Silva, E.J.; Varela, C.L.; Costa, S.C.; Silva, T.; Garrido, J.; Borges, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem.* **2015**, *83*, 235–2358.
- 189.- Marrazzo, G.; Barbagallo, I.; Galvano, F.; Malaguarnera, M.; Gazzolo, D.; Frigiola, A.; D’Orazio, N.; Li Volti, G. Role of dietary and endogenous antioxidants in diabetes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 1599–616.
- 190.- Vysakh, A.; Ratheesh, M.; Rajmohan, T.P.; Pramod, C.; Premal, S.; Girish kumar, E.; Sibi, P.I. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *20*, 124–130.
- 191.- Decker, E.A. **2002**. “Antioxidant mechanisms”. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Edited by: Akoh, C. C. and Min, D. B. New York: Marcel Dekker.
- 192.- Leopoldini, M.; Russo, N.; Chiodo, S.; Toscano, M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6343-6351.
- 193.- Primikyri, A.; Mazzone, G.; Lekka, C.; Tzakos, A.G.; Russo, N.; Gerothanassis, I.P. Understanding Zinc(II) chelation with quercetin and luteolin: A combined NMR and theoretical study. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 83-95.
- 194.- García-Ramos, J.C.; Galindo-Murillo, R.; Cortés-Guzman, F.; Ruiz-Azuara, L. Metal-based drug-DNA interactions. *J. of the Mex. Chem. Soc.* **2013**, *57*, 245-259.
- 195.- Vacek, J.; Zatloukalová, M.; Desmier, T.; Nezhodová, V.; Hrbac, J.; Kubala, M.; Kren, V.; Ulrichová, J.; Trouillas, P. Antioxidant, metal-binding and DNA-damaging properties of flavonolignans: A joint experimental and computational highlight base don 7-galloylsilybin. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *205*, 173-180.
- 196.- Reina, M.; Martínez, A. Is Silybin the Best Free Radical Scavenger Compound in Silymarin? *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4568-4578.

- 197.- Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 278-286
- 198.- Bai T.C.; Zhu J.J.; Hu J.; Zhang, H.L.; Huang, C.G. Solubility of silybin in aqueous hydrochloric acid solution. *Fluid Phase Equilib.* **2007**, *254*, 204-210.
- 199.- Martínez, A.; Barbosa, A. Antiradical power of carotenoids and vitamin E: Testing the hydrogen atom mechanism. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 16945-16951.
- 200.- Galano, A.; Vargas, R.; Martínez, A. Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 193-200.
- 201.- Najafi, M.; Farmanzadeh, D.; Klein, E.; Zahedi, M. A. Theoretical Study on the Enthalpies of Homolytic and Heterolytic N–H Bond Cleavage in Substituted Melatonins in the Gas–Phase and Aqueous Solution. *Acta Chim. Slov.* **2013**, *60*, 43-55.
- 202.- Camaioni, D.M.; Schwerdtfeger, C.A. Comment on accurate experimental values for the free energies of hydration of H^+ , OH^- , and H_3O^+ . *J Phys Chem A* **2005**, *109*, 10795–10797.
- 203.- Dorfman, L.M.; Adams, G.E. Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions, National Bureau of Standards, Washington, D. C., NSRDS-NBS 46, **1973**, 32-37.

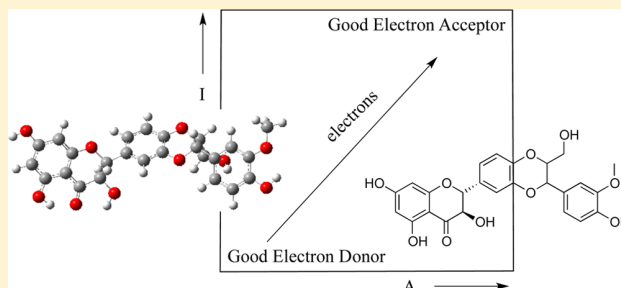
Is Silybin the Best Free Radical Scavenger Compound in Silymarin?

Miguel Reina and Ana Martínez*

Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, CU, P.O. Box 70-360, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

Supporting Information

ABSTRACT: Silymarin is a natural mixture with beneficial properties for health, specifically due to its antiradical characteristics. The major components of this mixture are silybin (SIL), silychristin (SILYC), isosilybin (ISOSIL), silydianin (SILYD), and taxifolin (TAX). In this report, the electronic properties of these substances are investigated using density functional theory calculations, mainly in order to fully understand the free radical scavenger properties of these compounds. Optimized geometries and Raman spectra are reported. These results could be experimentally useful for identifying some of the major components of the mixture. The relative abundance of deprotonated species under physiological conditions is also included. The free radical scavenger capacity is studied in relation to three mechanisms: the single electron transfer (SET), the radical adduct formation (RAF), and the hydrogen atom transfer (HAT). According to this investigation, the HAT mechanism is the most efficient mechanism for scavenging free radicals for these compounds followed by the RAF mechanism where intramolecular hydrogen bonds are formed in order to stabilize the $\cdot\text{OOH}$ free radical. A particularly important factor is that none of the compounds being studied showed an outstanding antiradical capacity performance compared to the others. In this sense, silymarin is an interesting mixture with antiradical properties and we now know that one single component should be as effective as the mixture.



INTRODUCTION

Milk thistle plant *S. marianum* (L.) Gaertn., Asteraceae¹ was identified previously by the ancient Greeks, but its medicinal properties were first described by the renaissance naturalists. This herbal plant has been consumed for decades because of its beneficial biological properties,^{2–15} which include hepatoprotective,^{3–5} anti-inflammatory,⁶ and anticancer activity.⁸ The active component of the plant, which is extracted from the seeds, is known as silymarin.⁹ Silymarin has been intensively studied in the last decades due to its antioxidant properties and its effectiveness against chemically induced skin damage.^{2–12} It is known that silymarin comprises a very complex mixture of flavonolignans with silybin (SIL) representing the principal and by far the most researched component. Silymarin contains other flavonolignan and flavonoid compounds, named silychristin (SILYC), isosilybin (ISOSIL), silydianin (SILYD), and taxifolin (TAX) (Figure 1). It is interesting to note that SIL, SILYC, ISOSIL, and SILYD are isomers. The mixture also includes other compounds (10–30%) such as 2,3-dehydrosilybin.¹⁴ Furthermore, it was reported that, except for 2,3-dehydrosilybin, none of the major components of silymarin mixture is phototoxic in skin *in vitro* cells.¹⁵

As previously reported, flavonolignans and related compounds are free radical scavengers.^{16–28} The correlation between the structure and the antiradical activity has been demonstrated, in particular for SIL.^{19,28} It has been determined experimentally and theoretically that, for SIL and deprotonated silybin ($\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}$), principal mechanisms for scavenging free

radicals include the single electron transfer (SET), the hydrogen atom transfer (HAT), and the radical adduct formation (RAF).^{19,28} In spite of studies²⁸ dealing with the antiradical properties of SIL and $\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}$, there are no reports about the free radical scavenging activity of the other components of silymarin. Silymarin consists of a complex mixture of flavonolignans, which in combination provide strong antiradical properties. Experimental results show excellent antioxidant activity for SIL, that is the major component of silymarin but not necessarily means that it is the best free radical scavenger. In order to reveal which component of the mixture represents the best free radical scavenger, it is important to investigate all of the compounds. To this end, we investigated the antiradical properties of the components of silymarin (SILYC, ISOSIL, SILYD, and TAX). We also provide a comparison with previous SIL results.

As previously reported, the relative abundance of deprotonated species under physiological conditions (pH 7.4) is the key to truly understanding their antioxidant properties.²⁸ Therefore, in this investigation, the relative abundance of deprotonated species at pH 7.4 for each compound is also included, as well as its capacity to stabilize free radicals from the deprotonated species ($\text{SILYC}_{(-\text{H})}^{-1}$, $\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}$, $\text{ISOSIL}_{(-\text{H})}^{-1}$, $\text{SILYD}_{(-\text{H})}^{-1}$, and $\text{TAX}_{(-\text{H})}^{-1}$). Optimized geometries and

Received: March 17, 2016

Revised: May 4, 2016

Published: May 5, 2016

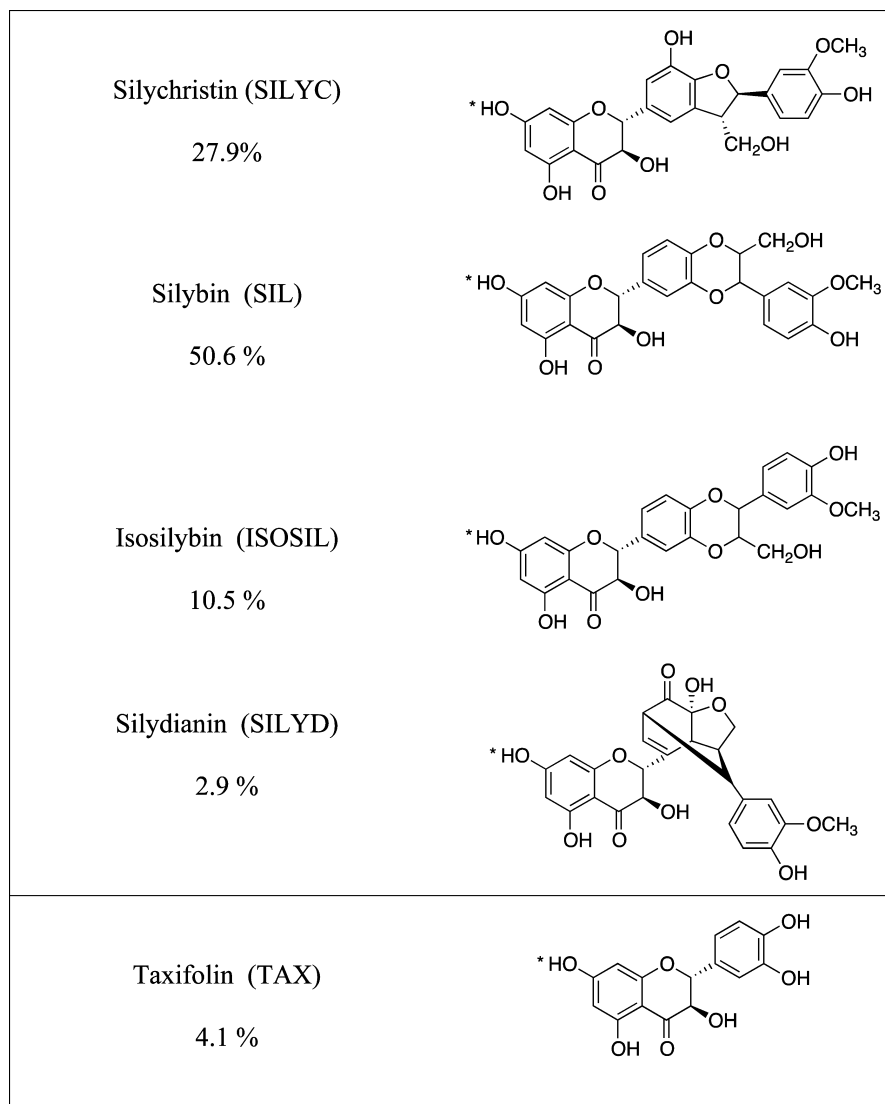


Figure 1. Chemical structures of the major components of silymarin. The labels used in this work are included. Relative abundance (in %) is also reported (Aldrich MDL number MFCD01776359). Stars (*) indicate the acid proton for further reference.

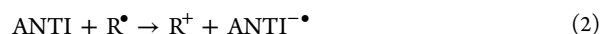
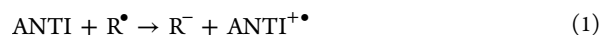
Raman spectra are reported. These results may be experimentally useful for identifying some of the major components of the mixture. The free radical activity is analyzed with regard to three different mechanisms: SET, RAF, and HAT. In the following, it becomes apparent that SIL is neither the most stable isomer nor the best free radical scavenger found in silymarin. In fact, none of the analyzed compounds present outstanding free radical scavenger behavior compared to the others. This is explained by the fact that all molecules share the flavonoid skeleton, which probably guides the antiradical reactivity.

COMPUTATIONAL DETAILS

All calculations were carried out with Gaussian 09 implementation.²⁹ Initial geometries were fully optimized at the M06/6-31+G(d) level of theory in the gas phase.^{30–34} This methodology has been successfully used to study small organic molecules.^{28,35–37} Harmonic analyses are calculated to verify local minima (zero imaginary frequencies). Marvin Sketch³⁸ is used to find the pK_a values at 298 K (pK_a min, 0; pK_a max, 14)

and to identify the relative abundance of the deprotonated species under physiological conditions.

The SET mechanism is analyzed using the following schemes:



ANTI represents all the molecules being studied that are reported in Figure 1 and also the corresponding deprotonated compounds. To investigate the SET mechanism, the vertical ionization energy (I) and vertical electron affinity (A) were obtained from single point calculations of the corresponding cationic and anionic molecules, using the optimized structure of the neutrals (or anions for the deprotonated molecules) and the 6-311+G(d,p) basis set. Water and DMSO are included to mimic polar and nonpolar environments. The full electron donor–acceptor map (FEDAM) is a useful, previously defined tool.^{39,40} In this map (Figure 2), I and A are plotted and allow us to classify substances as either donors or acceptors of electrons. Electrons are transferred from molecules located

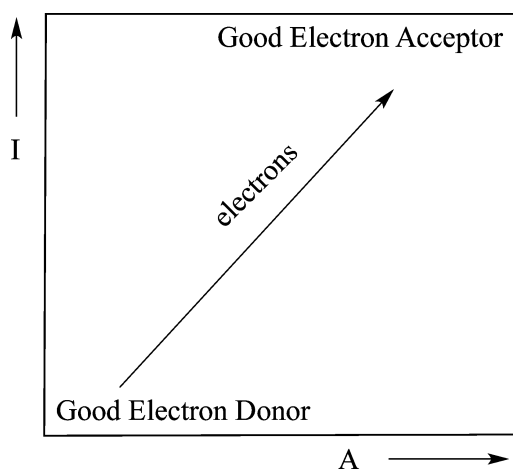
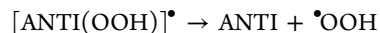


Figure 2. Full electron donor–acceptor map.

down to the left of the map (good electron donors) to those molecules that are up to the right (good electron acceptors).

The RAF mechanism is investigated using $\cdot\text{OOH}$ as a free radical expressed in the following equations.



$$\Delta E_{\text{RAF}} = [E(\cdot\text{OOH}) + E(\text{ANTI})] - E([\text{ANTI}(\text{OOH})]^\bullet) \quad (3)$$

$\cdot\text{OOH}$ is added to all of the C–C double bonds and also close to a number of oxygen atoms forming hydrogen bonds. The HAT mechanism is analyzed with the hydrogen transfer energy (ΔE_{HAT}) calculated as follows (eq 4)



$$\Delta E_{\text{HAT}} = [E(\text{ANTI}) + E(\text{R}^\bullet)] - [E(\text{RH}) + E(\text{ANTI}(-\text{H})^\bullet)] \quad (4)$$

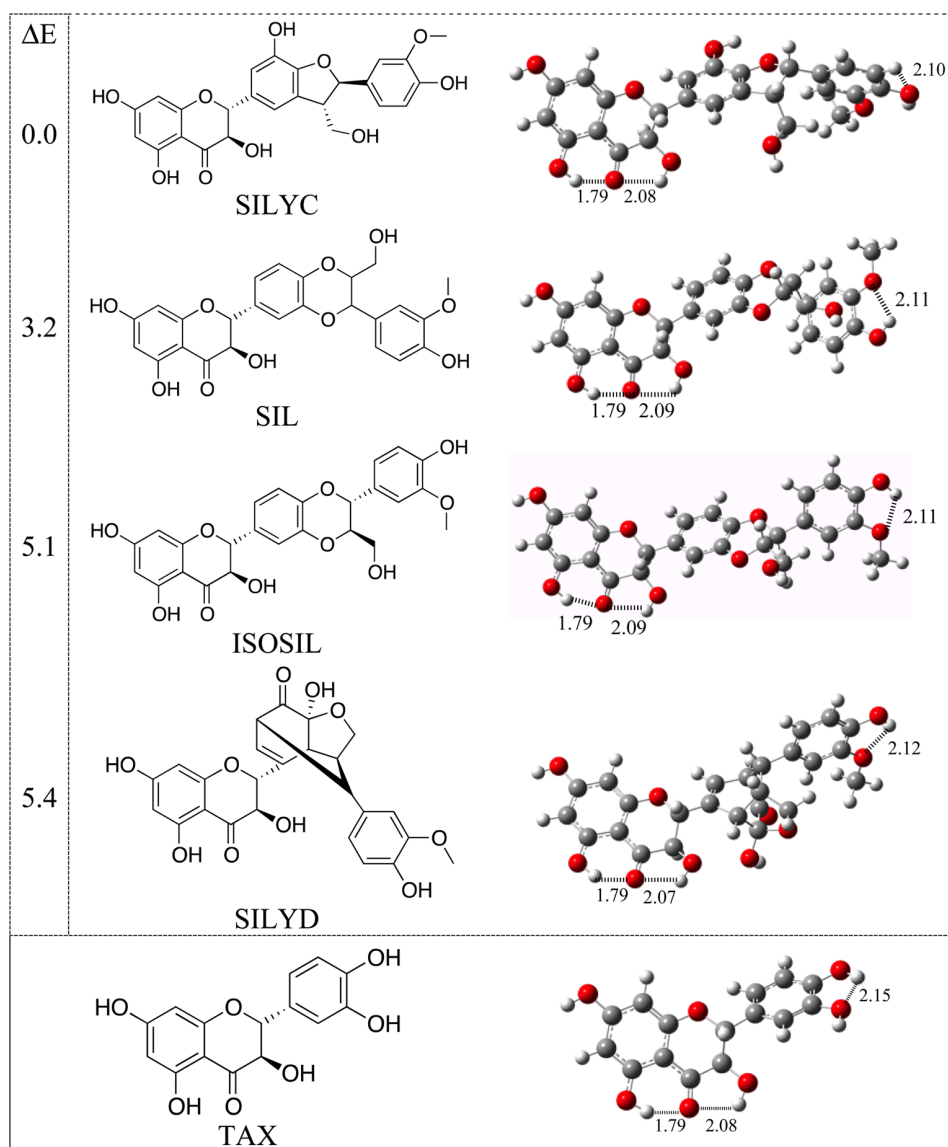


Figure 3. Schematic representation and optimized geometries of major components of silymarin. Molecules inside the dashed square are isomers ($\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$). ΔE (in kcal/mol) corresponds to the energy differences between the isomers with respect to the most stable.

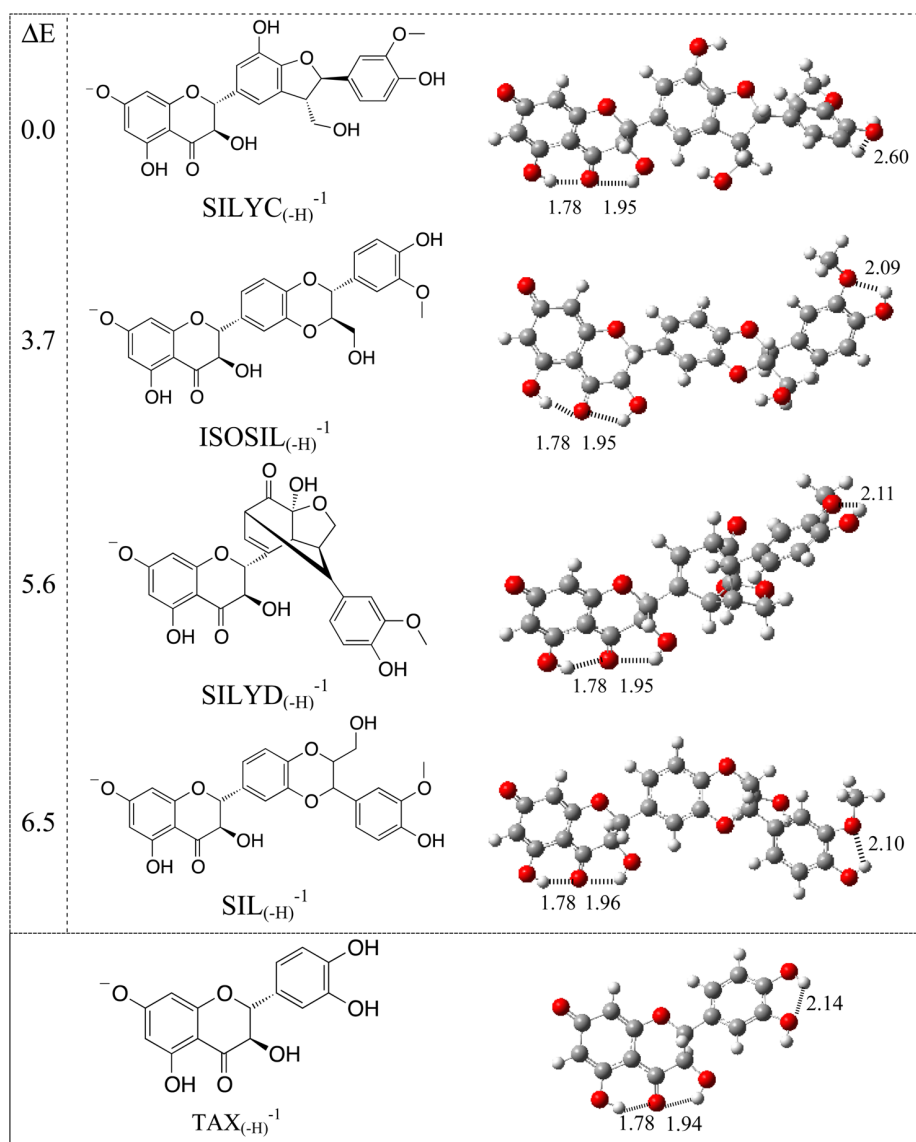


Figure 4. Schematic representation and optimized geometries of major deprotonated components of silymarin. Molecules inside the dashed square are isomers ($C_{25}H_{21}O_{10}^{-1}$). ΔE (in kcal/mol) corresponds to the energy difference between the isomers with respect to the most stable.

ANTI(-H) \cdot is the antiradical molecule, less one hydrogen atom, and RH is the free radical molecule with one bonded H atom. Five different free radicals ($R\cdot = \cdot OH, \cdot OOH, NO_2\cdot, CH_3O\cdot,$ and $C_6H_5O\cdot$) are used to analyze this mechanism.

RESULTS AND DISCUSSION

Geometry Optimization. The major components of silymarin may be deprotonated under physiological conditions. The calculated relative abundance at a pH of 7.4 for the five molecules considered in this investigation indicates that 30% are deprotonated (approximately, see Table S1 of the Supporting Information). This result shows it is important to consider the deprotonated compounds in order to complete the description of the antiradical properties under physiological conditions. Previous results for SIL were considered in order to select the initial geometries for optimization.²⁸ It was reported that intramolecular hydrogen bonds are very important for the stabilization of this molecule so that, for this reason, as much as

possible we used initial geometries that contain intramolecular hydrogen bonds.

Figures 3 and 4 present a schematic representation and the optimized structures of SIL, SILYC, ISOSIL, SILYD, and TAX and deprotonated molecules, respectively. In each figure, structures inside the dashed square are isomers, as they have the same chemical formula ($C_{25}H_{22}O_{10}$ and $C_{25}H_{21}O_{10}^{-1}$ for the deprotonated molecules). SILYC is the most stable isomer followed by SIL ($\Delta E = 3.2$ kcal/mol), ISOSIL ($\Delta E = 5.1$ kcal/mol), and SILYD ($\Delta E = 5.4$ kcal/mol). In terms of deprotonated species, $SILYC_{(-H)}^{-1}$ is the most stable isomer followed by $ISOSIL_{(-H)}^{-1}$ ($\Delta E = 3.7$ kcal/mol), $SILYD_{(-H)}^{-1}$ ($\Delta E = 5.6$ kcal/mol), and $SIL_{(-H)}^{-1}$ ($\Delta E = 6.5$ kcal/mol). The greatest energy difference is less than 7 kcal/mol, and these compounds can be expected to coexist under experimental conditions.

Figures 3 and 4 present optimized molecules indicating the hydrogen bond lengths (in Å). All optimized structures have at least three hydrogen bonds: two related to the flavonoid

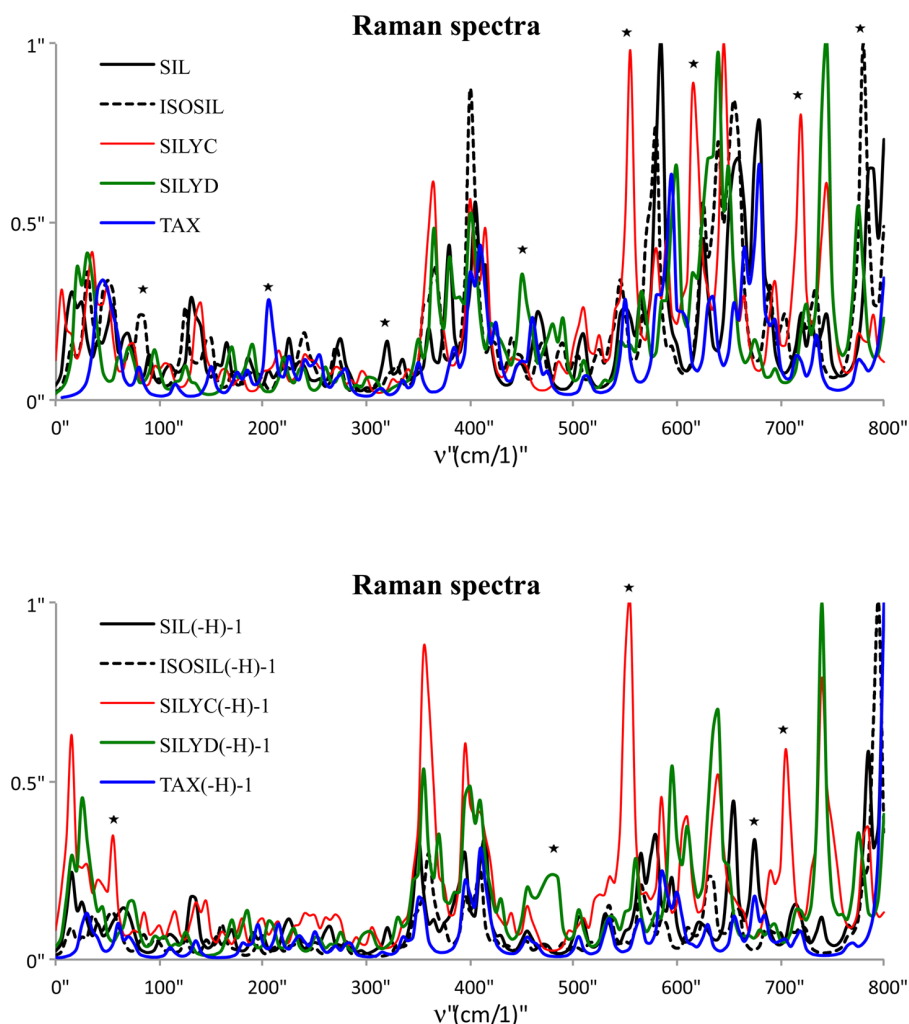


Figure 5. Raman spectra for major components and major deprotonated components of silymarin.

skeleton between the carbonyl and the hydroxyl groups and the third one between OCH_3 and OH of the aromatic ring. TAX also presents intramolecular hydrogen bonds. Comparing the optimized structures, the differences between two of the hydrogen bond lengths are not significant, as they are practically the same, even considering the deprotonated species. However, there is one H bond distance that is shorter for the deprotonated molecules (Figure 4) than for the others (Figure 3). As expected, deprotonated molecules present a stronger H bond.

Raman Spectra. The characterization of these compounds can be made experimentally using infrared and Raman spectra, with the Raman spectra being very useful due to the surface-enhanced-Raman-scattering (SERS) technique. To help with the experimental characterization, Figure 5 reports the theoretical Raman spectra for the compounds under study. There are important differences in the Raman spectra (indicated by stars) that enable us to make the characterization. SIL and ISOSIL are similar, but in the case of ISOSIL, there are two signals at 80 and at 780 cm^{-1} , which are not characteristic of SIL. This difference could be helpful for distinguishing between these two molecules. SILYC presents three signals that are not present for the other compounds at 555, 615, and 720 cm^{-1} , and SILYD shows a unique signal at 450 cm^{-1} . TAX, the

only molecule that is not an isomer, shows an exclusive signal at 205 cm^{-1} . For deprotonated compounds, we also found significant differences. For $\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}$, a unique signal around 675 cm^{-1} was found. For $\text{SILYC}_{(-\text{H})}^{-1}$, there are three major signals at 55, 555, and 705 cm^{-1} . Finally, for $\text{SILYD}_{(-\text{H})}^{-1}$, there is a signal around 475 cm^{-1} that is not present in the case of the other molecules. For $\text{ISOSIL}_{(-\text{H})}^{-1}$ and $\text{TAX}_{(-\text{H})}^{-1}$, no distinguishable signals were found in the Raman spectra. Comparing the two Raman spectra, we were able to distinguish the deprotonated compounds. SIL presents an important peak at 585 cm^{-1} that is not evident in the case of $\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}$. Identification of SILYC and $\text{SILYC}_{(-\text{H})}^{-1}$ is possible due to the signal around 15 cm^{-1} for $\text{SILYC}_{(-\text{H})}^{-1}$. ISOSIL shows an important signal at 400 cm^{-1} , which is not present for $\text{ISOSIL}_{(-\text{H})}^{-1}$. For SILYD and $\text{SILYD}_{(-\text{H})}^{-1}$, the shape of the signal around 475 cm^{-1} changes significantly, making it possible to distinguish one from another. Finally, we were able to recognize TAX to $\text{TAX}_{(-\text{H})}^{-1}$ because of the signal at 205 cm^{-1} of TAX. For deprotonated compounds, Raman spectra are less intense. The main conclusion concerning the Raman spectra is that it makes it possible to characterize different components of the mixture and also the deprotonated molecules.

Antiradical Capacity. *Single Electron Transfer (SET).* The full electron donor–acceptor maps of the molecules being

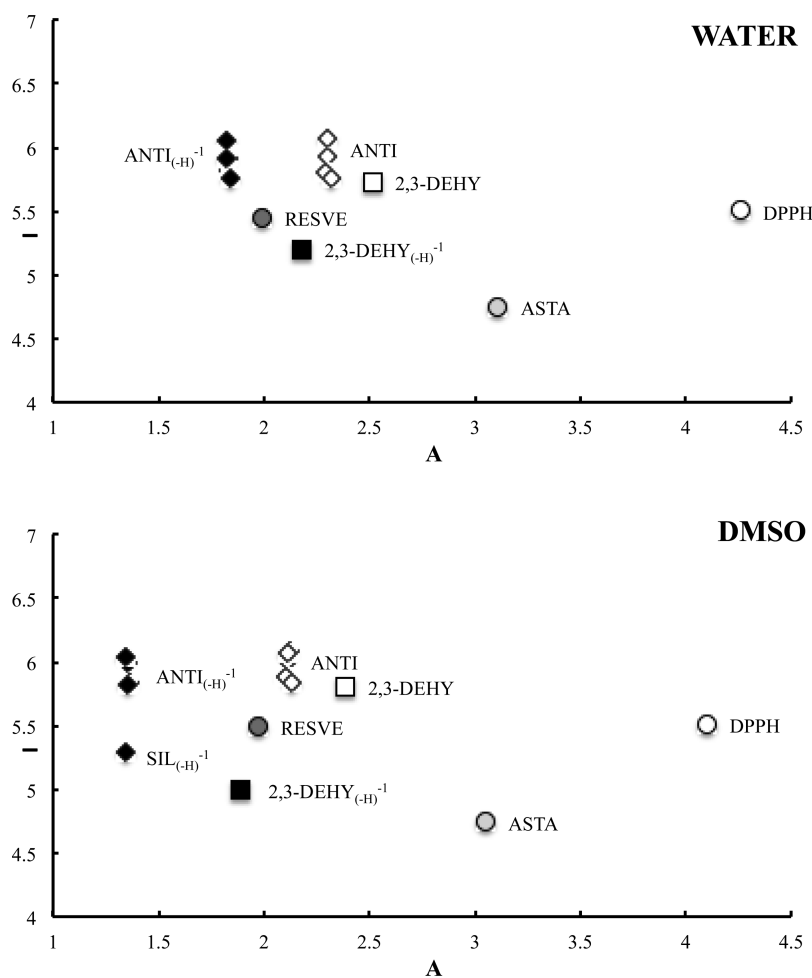


Figure 6. Full electron donor–acceptor map for the major components of silymarin mixture and their deprotonated compounds. DPPH[•], astaxanthina (ASTA), resveratrol (RESVE), 2,3-dehydrosilybin (2,3-DEHY), and deprotonated 2,3-dehydrosilybin (2,3-DEHY_(-H)⁻¹) are included for comparisons.

studied are reported in Figure 6, considering water and DMSO as solvent to mimic polar and nonpolar environment. Astaxanthin (ASTA), resveratrol (RESVE), silybin (SIL), deprotonated silybin (SIL_(-H)⁻¹), 2,3-dehydrosilybin (2,3-DEHY), and deprotonated 2,3-dehydrosilybin (2,3-DEHY_(-H)⁻¹) were reported previously²⁸ and are included for purposes of comparison. DPPH[•] is taken into account, as it is a stable free radical that is very useful for experimental determination of free radical scavenger activity. All compounds in the study present higher *I* values than ASTA, RESVE, and DPPH[•], meaning that none can transfer electrons to DPPH[•]. As electron acceptors, all neutral molecules represent slightly better electron acceptors than RESVE but worse than ASTA and DPPH[•]. As expected, deprotonated molecules represent worse electron acceptors (smaller *A* values) than the others. Except for SIL_(-H)⁻¹ in DMSO which presents a smaller *I* value and represents a better electron donor, the other deprotonated molecules do not represent better electron donors than the neutral molecules. Comparing with 2,3-DEHY and 2,3-DEHY_(-H)⁻¹, it is evident that major components of silymarin represent worse electron donors (*I* larger) and, therefore, worse free radical scavengers than 2,3-DEHY. As previously reported,²⁸ both SIL_(-H)⁻¹ and 2,3-DEHY_(-H)⁻¹ are able to donate electrons to stabilize DPPH[•] with the transfer electron

mechanism being less effective for SIL_(-H)⁻¹. This concurs with previous experimental results indicating that this last molecule represents a better free radical scavenger than SIL.²⁸ The conclusion from the SET mechanism is that no significant differences are apparent among the major components of silymarin mixture. As a result, major silymarin components are not able to either donate or accept electrons from DPPH[•]. Due to its position on the map, none of the major compounds included in the silymarin mixture is able to stabilize DPPH[•] by the electron transfer mechanism. Only SIL_(-H)⁻¹, in a nonpolar environment such as DMSO, could effectively stabilize DPPH[•].

Radical Adduct Formation (RAF). Except for SIL,²⁸ there are no experimental or theoretical results that analyze the free radical scavenging properties of the major compounds of silymarin mixture with [•]OOH. In this report, we analyze the adduct formation mechanism using [•]OOH as a free radical and 10 molecules as free radical scavengers (SILYC, SIL (reported previously),²⁸ ISOSIL, SILYD, TAX, SILYC_(-H)⁻¹, SIL_(-H)⁻¹, ISOSIL_(-H)⁻¹, SILYD_(-H)⁻¹, and TAX_(-H)⁻¹). The [•]OOH radical was systematically added to every C–C, C–O double bond or close to the oxygen atoms where hydrogen bonds can be formed. All systems were fully optimized. Tables S2–S11 show the results of dissociation energies for each free radical adduct compound, indicating the position of the addition.

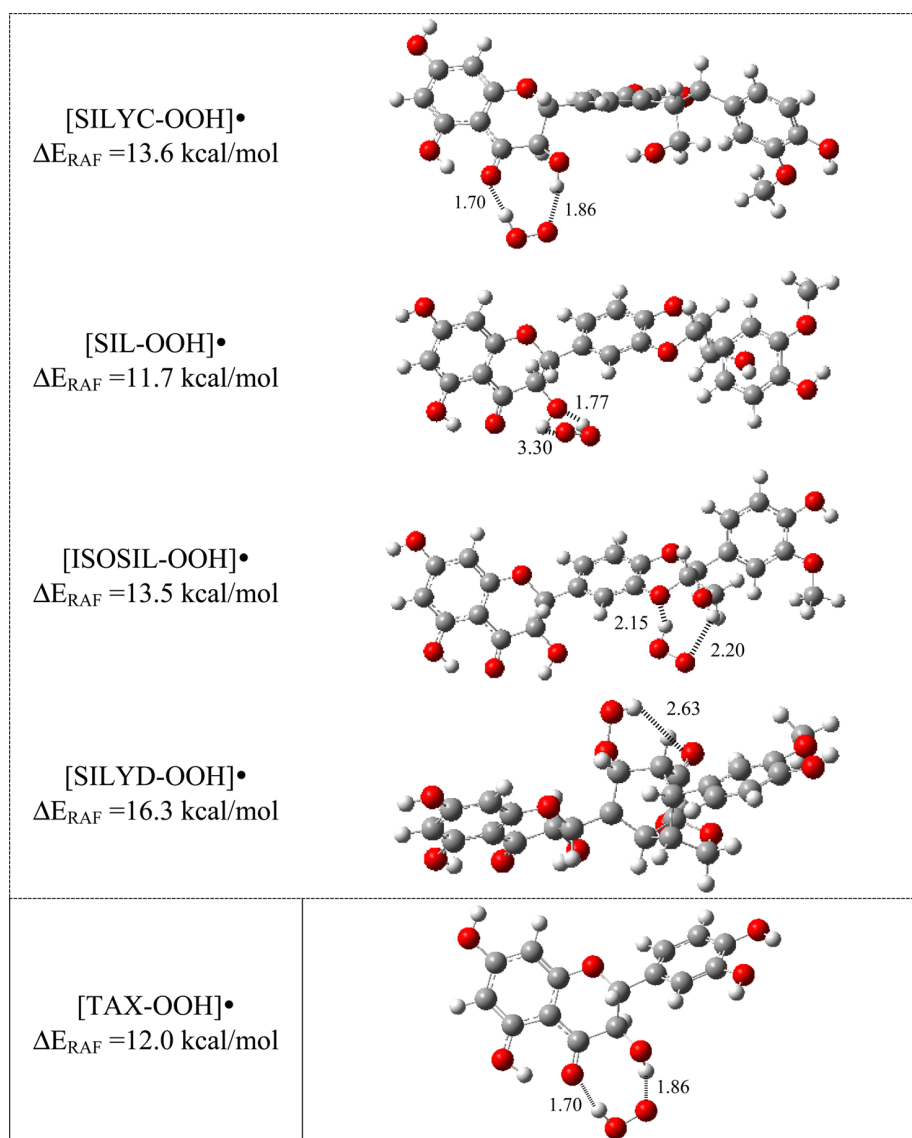


Figure 7. Optimized structures for the most stable ANTI adduct with •OOH and the dissociation energies (kcal/mol) for each compound being studied in the following scheme: [ANTI-OOH]• → ANTI + •OOH. Intramolecular hydrogen bonds are formed, and distance lengths are reported in Å.

Positive dissociation energies indicate that the adduct is more stable than the dissociative products. Figures 7 and 8 report the most stable free radical adduct compounds and the ΔE_{RAF} (in kcal/mol) according to eq 3. All [ANTI-OOH]• are stable by more than 10 kcal/mol with respect to their dissociative products, which implies that the adduct formation is thermodynamically favorable. [SILYD-OOH]• is stable by 16.3 kcal/mol, [SILYC-OOH]• and [ISOSIL-OOH]• are also stable with ΔE_{RAF} equal to 13.6 and 13.5 kcal/mol, respectively, whereas [TAX-OOH]• and [SIL-OOH]• present dissociation energy values of 12.0 and 11.7 kcal/mol, respectively. For all of these molecules, •OOH is bonded to ANTI, mainly forming hydrogen bonds at different positions. In Figure 7, hydrogen bond lengths are also presented. Intramolecular hydrogen bond distances vary from 1.70 Å in [SILYC-OOH]• and [TAX-OOH]• to 3.30 Å for [SIL-OOH]•. In Figure 8, it is possible to see that deprotonated adducts are stable by approximately 17–18 kcal/mol. The

deprotonated adducts are slightly more stable than the corresponding neutral molecules. In every deprotonated molecule, the most reactive atom is the O of the carbonyl group, which forms hydrogen bonds with the •OOH. For these molecules, hydrogen bond length does not vary significantly from one compound to another. The hydrogen bond distance between the O from the C=O and the H from the •OOH free radical is 1.55–1.56 Å for all deprotonated species. The hydrogen bond lengths formed between the O of the •OOH and the H atom of the hydroxyl group of deprotonated molecules vary between 1.89 Å for [SILYD_(-H)⁻¹-OOH]• and 1.96 Å for [SILYC_(-H)⁻¹-OOH]•.

In summary, O atoms of major components of silymarin play a key role in stabilizing the •OOH free radical following the RAF mechanism. As for the SET mechanism, the RAF mechanism does not offer significant differences in antiradical capacity among these compounds. In this way, all compounds

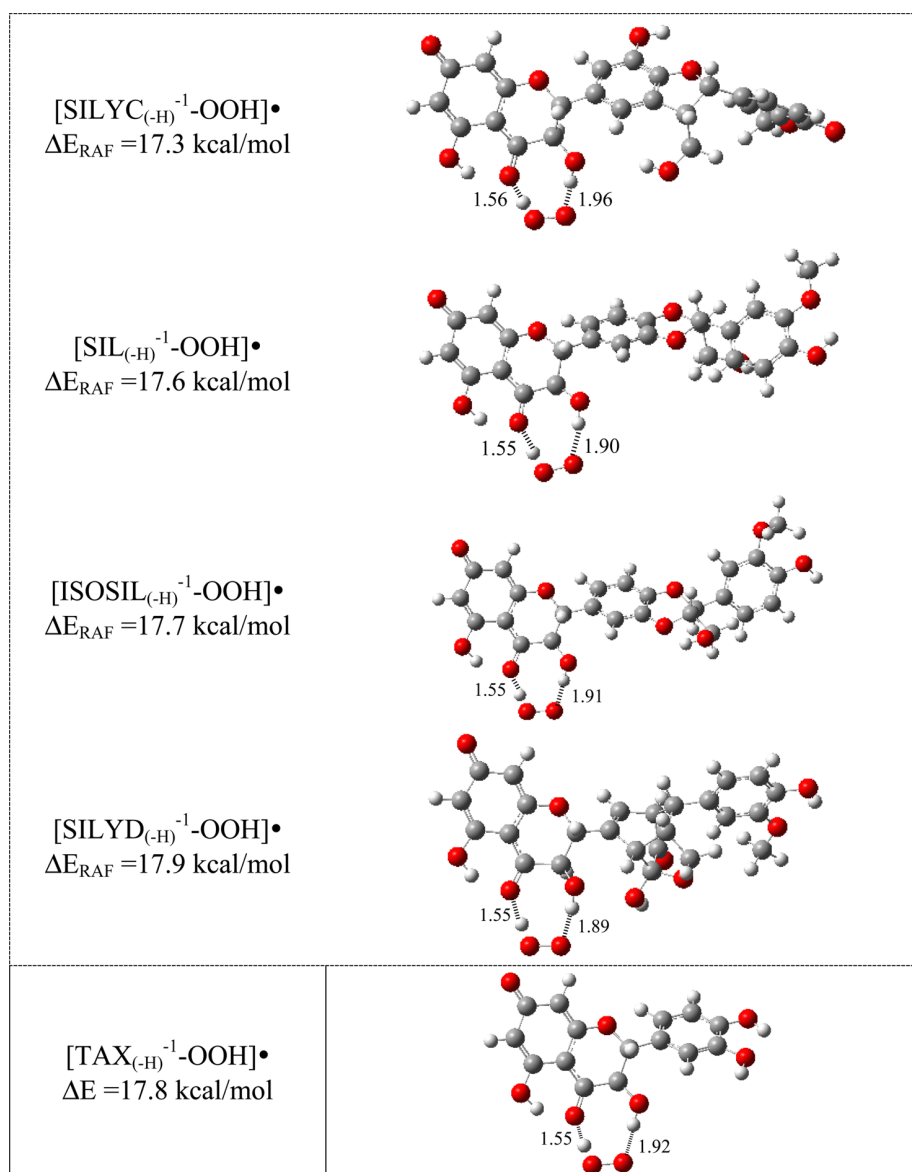


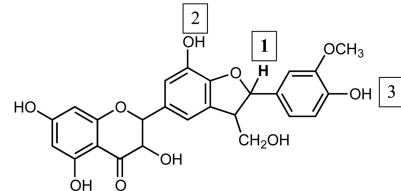
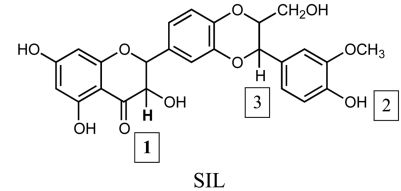
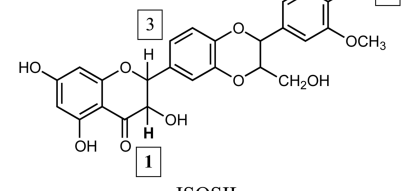
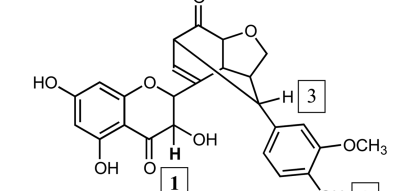
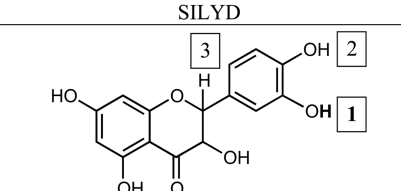
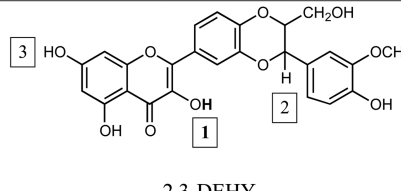
Figure 8. Optimized structures of the most stable ANTI adduct with $\bullet\text{OOH}$ and the dissociation energies (kcal/mol) of each deprotonated compound being studied in the following scheme: $[\text{ANTI}_{(-\text{H})}^{-1}\text{-OOH}]^{\bullet} \rightarrow \text{ANTI}_{(-\text{H})}^{-1} + \bullet\text{OH}$. Intramolecular hydrogen bonds are formed, and distance lengths are reported in Å.

under study show practically the same reactivity for the RAF mechanism with the $\bullet\text{OOH}$ free radical.

Hydrogen Atom Transfer (HAT). In order to evaluate the antiradical capacity of the compounds being studied, we also considered the HAT mechanism. For this purpose, all the hydrogen atoms of the molecules were dissociated one by one, and only the three most stable dehydrogenated molecules were considered for this discussion. The HAT mechanism was analyzed considering five different free radicals: $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, NO_2^{\bullet} , $\text{CH}_3\text{O}^{\bullet}$, and $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^{\bullet}$. Table 1 reports ΔE_{HAT} (see eq 4). Positive ΔE_{HAT} values indicate that the stabilization of the free radical is thermodynamically favorable. According to eq 4 and the selected free radicals, the products RH are H_2O for the $\bullet\text{OH}$ free radical, H_2O_2 for the $\bullet\text{OOH}$ free radical, HNO_2 for the NO_2^{\bullet} free radical, and CH_3OH and $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ for $\text{CH}_3\text{O}^{\bullet}$ and $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^{\bullet}$, respectively.

As far as we know, the only HAT study for these molecules was carried out by Trouillas et al.¹⁹ These authors reported the bond dissociation enthalpies of the H atom for four OH groups for SIL and 2,3-DEHY. The abstraction of the H atoms for the remaining positions was not taken into account, and the overall conclusion is that HAT may be the main mechanism for 2,3-DEHY, as it is much more effective for this than for SIL. In this study, we complete this first description by taking into account all H atoms in every molecule being studied and by considering diverse free radicals in the HAT mechanism reaction. As a result of doing this, we found that the H atoms from the hydroxyl group produce stable dehydrogenated molecules, however not necessarily the most stable ones. For SIL, there are two H atoms that do not correspond to OH groups that are reactive (Table 1, SIL, reactive positions 1 and 3). For 2,3-DEHY, there is one reactive position (2, Table 1) that was not considered before. By comparing the reactivity of these

Table 1. HAT Study^a

MOLECULE	Reactive positions	ΔE_{HAT}				
		$\bullet\text{OH}$	$\bullet\text{OOH}$	$\text{NO}_2\bullet$	$\text{CH}_3\text{O}\bullet$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\bullet$
 SILYC	1	35.6	3.5	-4.6	21.0	2.3
	2	35.1	3.1	-5.0	20.6	1.9
	3	33.9	1.8	-6.3	19.3	0.6
 SIL	1	36.2	4.1	-4.0	21.7	2.9
	2	32.9	0.8	-7.3	18.3	-0.4
	3	32.6	0.5	-7.6	18.1	-0.7
 ISOSIL	1	36.3	4.3	-3.9	21.8	3.0
	2	33.4	1.3	-6.8	18.8	0.1
	3	29.6	-2.5	-10.6	15.0	-3.7
 SILYD	1	38.9	6.9	-1.3	24.4	5.6
	2	34.1	2.1	-6.0	19.6	0.9
	3	31.5	-0.6	-8.7	16.9	-1.8
 TAX	1	41.8	9.7	1.6	27.3	8.5
	2	33.2	1.2	-7.0	18.7	-0.1
	3	30.9	-1.1	-9.2	16.4	-2.3
 2,3-DEHY	1	34.2	2.1	-6.0	19.6	0.9
	2	32.6	0.5	-7.6	18.0	-0.7
	3	28.3	-3.8	-11.9	13.7	-5.0

^a ΔE_{HAT} values (in kcal/mol) for the indicated H atom are presented.

molecules with different free radicals, we determined that the HAT mechanism is not more important for 2,3-DEHY than for SIL. In this way, this report completed what Trouillas et al. previously initiated.¹⁹

As expected, all analyzed compounds are able to stabilize the $\bullet\text{OH}$ free radical, as this is the most unstable and reactive free radical. All molecules showed three positive and high values of ΔE_{HAT} when the reaction is with this free radical. The stabilization of $\bullet\text{OOH}$ free radical is also possible for all compounds. ΔE_{HAT} are smaller than those for the reaction with $\bullet\text{OH}$, but they are positive and the reaction is feasible. Notably,

according to the HAT mechanism, none of the compounds being studied is able to stabilize $\text{NO}_2\bullet$, as all ΔE_{HAT} values are negative (the exception is a small positive value for TAX). For the $\text{CH}_3\text{O}\bullet$, we observe a similar behavior to that of $\bullet\text{OH}$ because every molecule is capable of stabilizing this free radical and shows high values of ΔE_{HAT} . The greatest difference in terms of the antiradical capacity of these molecules following the HAT mechanism occurs with $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\bullet$. For the dehydrogenated stable molecules studied, the only significant value is for TAX (8.5 kcal/mol) and SILID (5.6 kcal/mol). The

other dehydrogenated compounds present positive values considering one or two positions, but the values are small.

This analysis provides an indication of the free radical capacity of each of the compounds. In spite of this, the main conclusion concerning the HAT mechanism is that none of the compounds shows significantly greater antiradical reactivity compared to the others. This corroborates the proposition that what makes silymarin a strong antiradical mixture is not one component. One single component should be as effective as the mixture.

CONCLUSIONS

The main conclusion of this investigation is that SIL is neither the most stable compound nor the best free radical scavenger considering the major components of silymarin mixture in terms of single electron transfer (SET), radical adduct formation (RAF), and hydrogen atom transfer (HAT) mechanisms. In fact, none of the compounds analyzed manifest better antiradical reactivity than the others. Accordingly, silymarin is an interesting mixture with antiradical properties and now we know that one single component should be as effective as the mixture.

It is possible to identify some of the more abundant components of the mixture applying Raman spectroscopy. Raman spectra allows us to identify four major components and three major deprotonated compounds of the silymarin mixture: SILYC, ISOSIL, SILYD, and TAX and $\text{SILYC}_{(-\text{H})}^{-1}$, $\text{SIL}_{(-\text{H})}^{-1}$, and $\text{SILYD}_{(-\text{H})}^{-1}$.

The SET mechanism shows that deprotonated compounds represent slightly better electron donors but worse electron acceptors than neutral molecules, but in both cases, molecules show similar electron donor–acceptor capacity.

The analysis of the RAF mechanism with $\bullet\text{OOH}$ allows us to conclude that deprotonated species increase the stability of formed adduct but the antiradical capacity is practically the same for every molecule analyzed.

Hydrogen atom transfer (HAT) mechanisms indicated that, from a global point of view, no notable difference exists between any of the molecules.

For the compounds being analyzed, the SET mechanism appears to be the least favorable for stabilizing free radicals, whereas the HAT mechanism is apparently the most propitious. In the case of the RAF mechanism, stable free radical adducts are formed but notably it is possible to make successive additions in order to prove the capacity of this kind of molecule for stabilizing more than one free radical. This offers an interesting subject for further investigation.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpbc.6b02807.

Optimized structures, relative abundance of compound under study at physiological conditions, and complete references with more than 10 authors (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: martina@unam.mx. Phone: (52-5) 56 22 4500. Web page: <http://www.iim.unam.mx/martina/>.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by DGAPA-PAPIIT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and resources provided by the Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM). This work was carried out using a NES supercomputer, provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We would like to thank the DGTIC of UNAM for their excellent and free supercomputing services and Caroline Karslake (Masters, Social Anthropology, Cambridge University, England) for reviewing the grammar and style of the text in English. The authors would like to acknowledge Oralia L Jiménez A., María Teresa Vázquez, and Caín González for their technical support. M.R. thanks CONACyT for the PhD scholarship (387687).

REFERENCES

- (1) Morazzoni, P.; Bombardelli, E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* **1995**, *LXVI*, 3–42.
- (2) Milić, N.; Milosević, N.; Suvajdžić, L.; Zarkov, M.; Abenavoli, L. New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1801–1810.
- (3) Saller, R.; Meier, R.; Brignoli, R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* **2001**, *61*, 2035–2063.
- (4) Wellington, K.; Jarvis, B. Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs* **2001**, *15*, 465–489.
- (5) Loguercio, C.; Festi, D. Silybin and the liver: from basic research to clinical practice. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 2288–2301.
- (6) Gažák, R.; Walterová, D.; Křen, V. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 315–338.
- (7) Balian, S.; Ahmad, S.; Zafar, R. Antiinflammatory activity of leaf and leaf callus of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. in albino rats. *Indian J. Pharmacology* **2006**, *38*, 213–214.
- (8) Agarwal, R.; Agarwal, C.; Ichikawa, H.; Singh, R. P.; Aggarwal, B. H. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4457–4498.
- (9) Wagner, H.; Hörhammer, L.; Münster, R. On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneimittelforschung* **1968**, *18*, 688–696.
- (10) Mira, L.; Silva, M.; Manso, C. F. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 753–759.
- (11) Gažák, R.; Svobodová, A.; Psotová, J.; Sedmera, P.; Prikrylová, V.; Walterová, D.; Křen, V. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5677–5687.
- (12) Katiyar, S. K. Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 169.
- (13) Šimánek, V.; Křen, V.; Ulrichová, J.; Vicar, J.; Cvak, L. Silymarin: what is in the name...? An appeal for a change of editorial policy. *Hepatology* **2000**, *32*, 442–444.
- (14) Abenavoli, L.; Capasso, R.; Milić, N.; Capasso, F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 1423–1432.
- (15) Rajnochová Svobodová, A.; Zálešák, B.; Biedermann, D.; Ulrichová, J.; Vostálová, J. Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. *J. Photochem. Photobiol., B* **2016**, *156*, 61–68.
- (16) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152–159.
- (17) Martínez, A. Donator acceptor map of psittacofulvins and anthocyanins: are they good antioxidant substances? *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4915–4921.

- (18) Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584.
- (19) Trouillas, P.; Marsal, P.; Svobodová, A.; Vostálová, J.; Gazak, R.; Hrbáč, J.; Sedmera, P.; Kren, V.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. L.; et al. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 1054–1063.
- (20) Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3232–3237.
- (21) Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects and applications to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173–1183.
- (22) Zhang, H. Y.; Sun, Y. M.; Wang, X. L. Substituents effects on OH bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in that rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure-reactivity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9*, 502–508.
- (23) Leopoldini, M.; Pitarch, I. P.; Russo, N.; Toscano, M. Structure conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principal theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 92–96.
- (24) Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its raicals in the gas phase and in solvent. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *111*, 210–216.
- (25) György, I.; Antus, S.; Blázovics, A.; Földiák, G. Substituent effects in the free radical reactions of silybin: radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH. *Int. J. Radiat. Biol.* **1992**, *61*, 603–609.
- (26) van Wenum, E.; Jurczakowski, R.; Litwinienci, G. Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of the enol groups. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9102–9112.
- (27) Lemańska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zieliski, T.; Soffers, A. E. M.; Rietjens, I. M. C. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxylflavones. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *31*, 869–881.
- (28) Reina, M.; Martínez, A. Silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans as free radical scavengers. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 11597–11606.
- (29) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. *Gaussian 09*, revision A.08; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (30) 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.
- (31) Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193–218.
- (32) Petersson, G. A.; Al-Laham, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6081–6090.
- (33) McLean, A. D.; Chandler, G. S. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, $Z = 11–18$. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 5639–5648.
- (34) Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-Consistent molecular orbital methods. 20. Basis set for correlated wave-functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650–54.
- (35) Matisz, G.; Kelterer, A. M.; Fabian, W. M. F.; Kunsági-Máté, S. Coordination of methanol clusters to benzene: a computational study. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 10556–10564.
- (36) Meyer, M. M.; Kass, S. R. Experimental and theoretical gas phase acidities, bond dissociation energies, and heats of formation of HClO_x , $s = 1–4$. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 4086–4092.
- (37) Paukku, Y.; Hill, G. Theoretical determination of one-electron redox potentials for DNA bases, base pairs, and stacks. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 4804–4810.
- (38) Marvin 14.10.27, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- (39) Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M. A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 9037–9042.
- (40) Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on electron transfer reactions between carotenoids and free radicals. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12113–12120.



How the presence of metal atoms and clusters can modify the properties of Silybin? A computational prediction



Miguel Reina, Ana Martínez *

Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S.N. Ciudad Universitaria, P.O. Box 70-360, Coyoacán C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2016
Received in revised form 22 November 2016
Accepted 23 November 2016
Available online 24 November 2016

Keywords:

Donor Acceptor Map
Antioxidants
Metal interaction
Free radicals

ABSTRACT

Silybin and de-protonated silybin are well-known antiradical molecules. The interaction of these two molecules with metal atoms and clusters (tetramers) of Cu, Ag and Au may modify chemical properties. In this report, systems containing metal atoms and clusters (neutral and cationic systems) interacting with silybin and de-protonated silybin are analyzed, by applying Density Functional Theory (DFT) calculations. In order to explore changes in reactivity due to the presence of metals, the free radical scavenging properties of these new systems were studied by analyzing the electron transfer mechanism. Reactivity was also studied by considering the Molecular Electrostatic Potential maps of the most stable systems. Raman spectra were also obtained, both with and without metals. As apparent in this report, electron donor-acceptor capacity is improved with the presence of metals, and the presence of Cu, Ag and Au (atoms and clusters) considerably increases signals from the Raman spectra, which may be useful for experimental detection. The conclusion derived from this study is that the presence of metals not only enhances characterization signals but also modifies electron donor acceptor capacity.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Silybum marianum (milk thistle) is a medicinal plant that has received tremendous attention during the last decade due to new and emerging applications in medicine and also as a herbal remedy for liver treatment [1–8]. The useful extract from this plant is named silymarin [4], and comprises a natural mixture with beneficial properties for health, specifically related to its hepatoprotective and antiradical characteristics. In previous reports, [9] theoretical studies of the major components of silymarin indicate that, although all components of silymarin have peculiar properties, none of the compounds being studied registered outstanding antiradical capacity compared to the others. In this sense, silymarin is an interesting mixture with antiradical properties and we now know that all components studied present similar chemical properties [9].

The main component of silymarin is silybin (SIL) [3,4]. Silybin is a mixture of two diastereomers: silybin A and silybin B, being silybin B the most abundant in nature. SIL is a molecule with important antiradical properties [9–20]. The antiradical properties of SIL are considered to be responsible for its protective actions. SIL

is currently used as an active component in many dietary supplements, cosmetics and dermatological preparations. Studies have also considered the phototoxic potential of the main components of silymarin, however no phototoxicity was revealed for these compounds [21]. It has been suggested that SIL is a potential cancer preventive substance with multifactorial components that manifest anti-carcinogenic activities [22,23]. All these beneficial properties for health are apparently related to its strong antiradical activity. Previous investigations have focused on the antiradical properties of SIL; both theoretical and experimental [24–26]. Electron transfer is one of the reaction mechanisms that is important to analyze. This mechanism measures the capacity of an antiradical molecule to either donate or accept electrons in order to stabilize free radicals.

Antiradical properties of organic molecules change due to the interaction with transition metals [27]. In previous theoretical reports, it was shown that astaxanthin interacts with transition metals such as Cu and Cd [28]. This interaction between astaxanthin and metals modifies antiradical properties and makes the compounds redder in colour. In a subsequent investigation with shrimps, it was demonstrated that shrimps living in water with traces of copper became redder than those living in pure water [29]. Shrimps contain astaxanthin and although it is not possible to say that the change in colour is due to the interaction of astaxanthin and copper, it is a fact that the presence of copper modifies

* Corresponding author.

E-mail address: martina@unam.mx (A. Martínez).

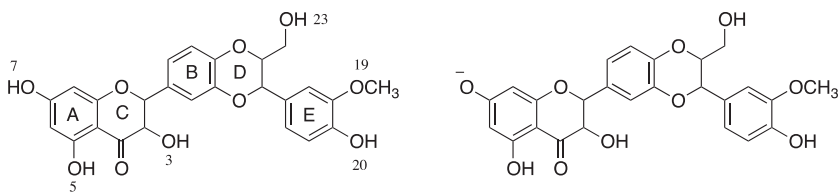


Fig. 1. Silybin (SIL) and de-protonated silybin ($[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$).

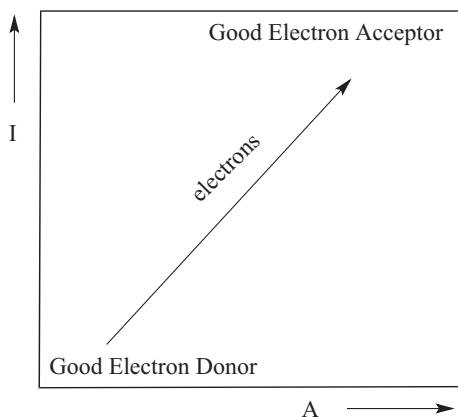


Fig. 2. Full electron donor-acceptor map.

the colour and chemical properties. Astaxanthin's ability to interact with metals is not unique. SIL is capable of interact with transition metals such as Cu^{2+} to produce a complex that has pro-oxidant properties [24–26]. Although all results indicate the antiradical properties of SIL, there are no theoretical investigations that analyze the interaction of SIL with transition metal atoms and clusters. It is however essential to discern how the presence of metal atoms and clusters can modify reactivity, because metals may increase their therapeutic capacity or modify properties so that substances no longer function as possible drugs.

It is well known that the interaction between organic molecules and transition metals increases the possibility of detecting single molecules in solution. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) [30–32] represents a useful technique resulting in strongly increased Raman signals from molecules, which have been attached to metallic structures. Due to their localized surface plasmon resonance, gold, silver and copper are commonly used to

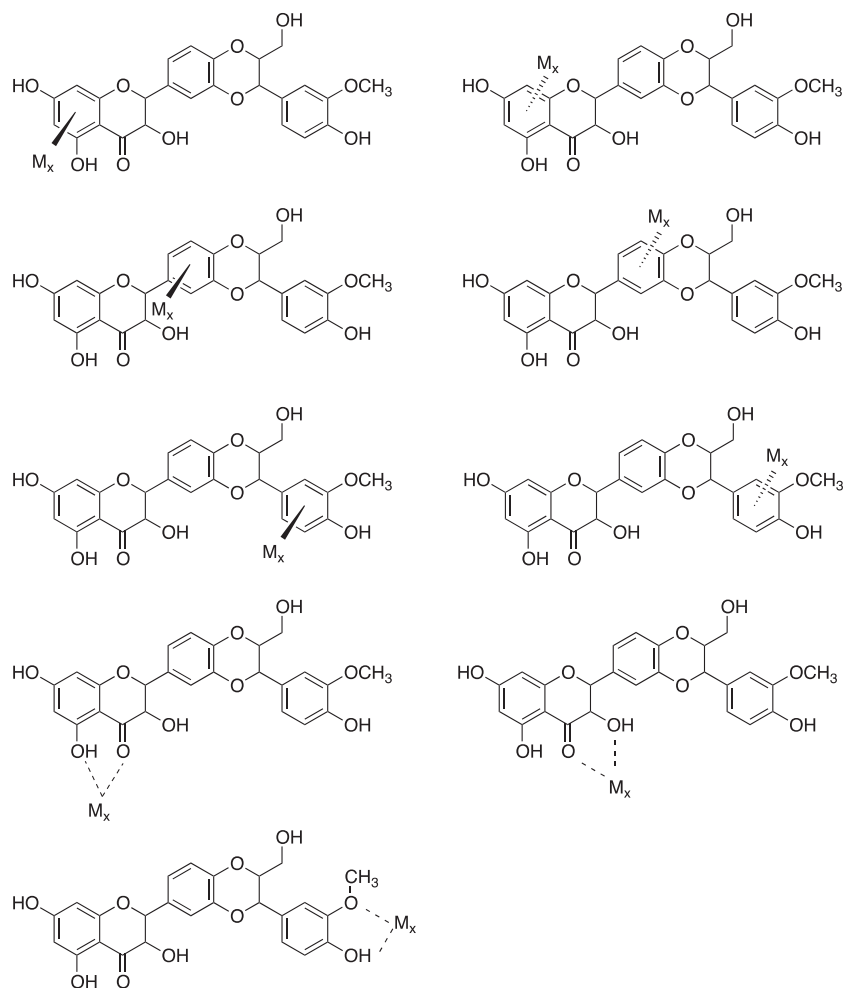


Fig. 3. Schematic representation of the initial geometries for SIL interacting with metal atoms and clusters (neutral and cationic systems). (M is Cu, Ag or Au; x is 1 or 4).

enhance the Raman signals [33]. For SIL, it is important to know if metal atoms and clusters increase the Raman signals in order to give more insights for the experimentalist.

In this report, we investigate the interaction of SIL with copper, silver and gold (atoms and clusters formed with four atoms). We use silybin B since it is 1.99 kcal/mol more stable than silybin A, and the studied properties here are similar for both diastereomers. As it has been demonstrated that under physiological conditions significant amounts of these compounds in their de-protonated form may be present, in this investigation we also consider de-protonated silybin ($[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$). Both SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ are important for explaining the benefits of silymarin. Optimized geometries, Raman spectra and some parameters with which to analyze chemical reactivity are reported for neutral and ionic species. Molecular Electrostatic Potential provides a useful procedure for analyzing charge distribution and inferring chemical reactivity.

2. Computational details

Gaussian 09 implementation [34] was used to calculate geometry optimization and electronic properties of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ (Fig. 1) interacting with metal atoms and clusters in gas phase. Neutral and cationic species were analyzed. Initial geometries were fully optimized at M06/LANL2DZ level of theory [35–42]. In order to verify optimized minima, harmonic analysis was performed and local minima were identified (zero imaginary frequencies). The lowest spin multiplicity (singlet or doublet) is the most stable for all the systems under study (See [Supplementary Material, S13](#)). Theoretical Raman spectra were obtained for all the optimized structures.

To study the interaction between atoms and metal clusters with SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ molecules, the ΔG binding energy was calculated at 298 K, according to the following schemes:

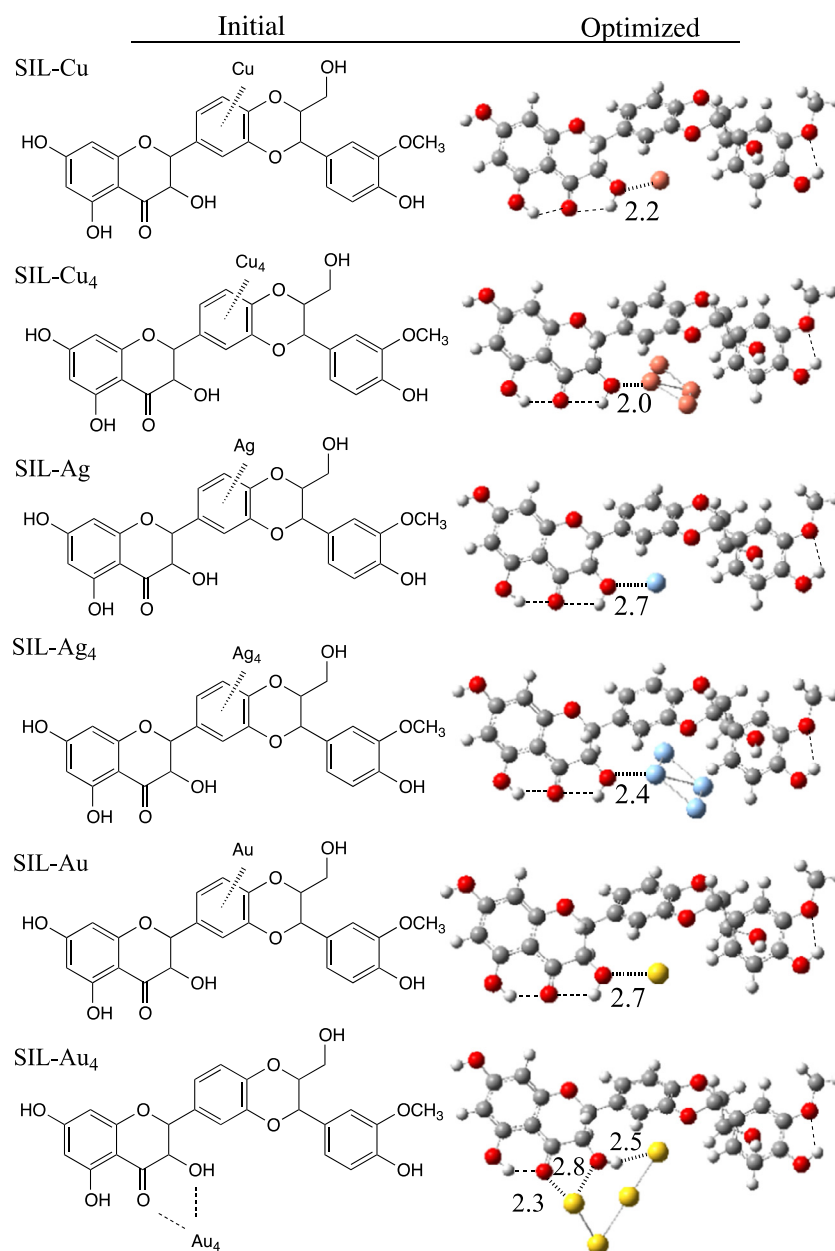
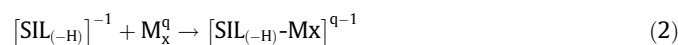


Fig. 4. Schematic and most stable optimized structures of SIL-M_x (M = Cu, Ag or Au; x = 1 or 4).



SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ are the two organic molecules under study, M is Cu, Ag or Au, x is the number of metal atoms (1 or 4), q symbolizes the atomic or molecular charge (0 or +1) and SIL-M_x^q and $[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{M}_x}]^{q-1}$ represents the metal atoms and clusters interacting with SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. ΔG binding energy is as follows:

$$\Delta G = G(\text{SIL-M}_x^q) - [G(\text{SIL}) + G(\text{M}_x^q)] \quad (3)$$

$$\Delta G = G([\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{M}_x}]^{q-1}) - [G([\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}) + G(\text{M}_x^q)] \quad (4)$$

In order to investigate the single electron transfer mechanism, vertical ionization energy (*I*) and vertical electron affinity (*A*) were obtained from single point calculations of cationic and anionic

molecules, using the optimized structure of the neutrals and the 6-311+g(d,p) basis set for C, H and O and LANL2DZ for metal atoms. Water was included to simulate polar environment with SMD continuum model [43]. A useful tool defined previously is the electron Full Electron Donor Acceptor Map (FEDAM) [44,45]. In this map (see Fig. 2) *I* and *A* are plotted and allow us to classify substances as either donors or acceptors of electrons. Electrons will be transferred from molecules located down to the left of the map (good electron donors) to those molecules that are up to the right (good electron acceptors).

The Molecular Electrostatic Potential of a molecule is a good guide to assess the reactivity towards reactants positively or negatively charged and furthermore to analyze changes in charge distribution. Molecular Electrostatic Potential was obtained for SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ and the new systems formed, SIL-M_x^q and $[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{M}_x}]^{q-1}$, using the total electron density to analyze the force acting on a positive test charge located in the vicinity of a

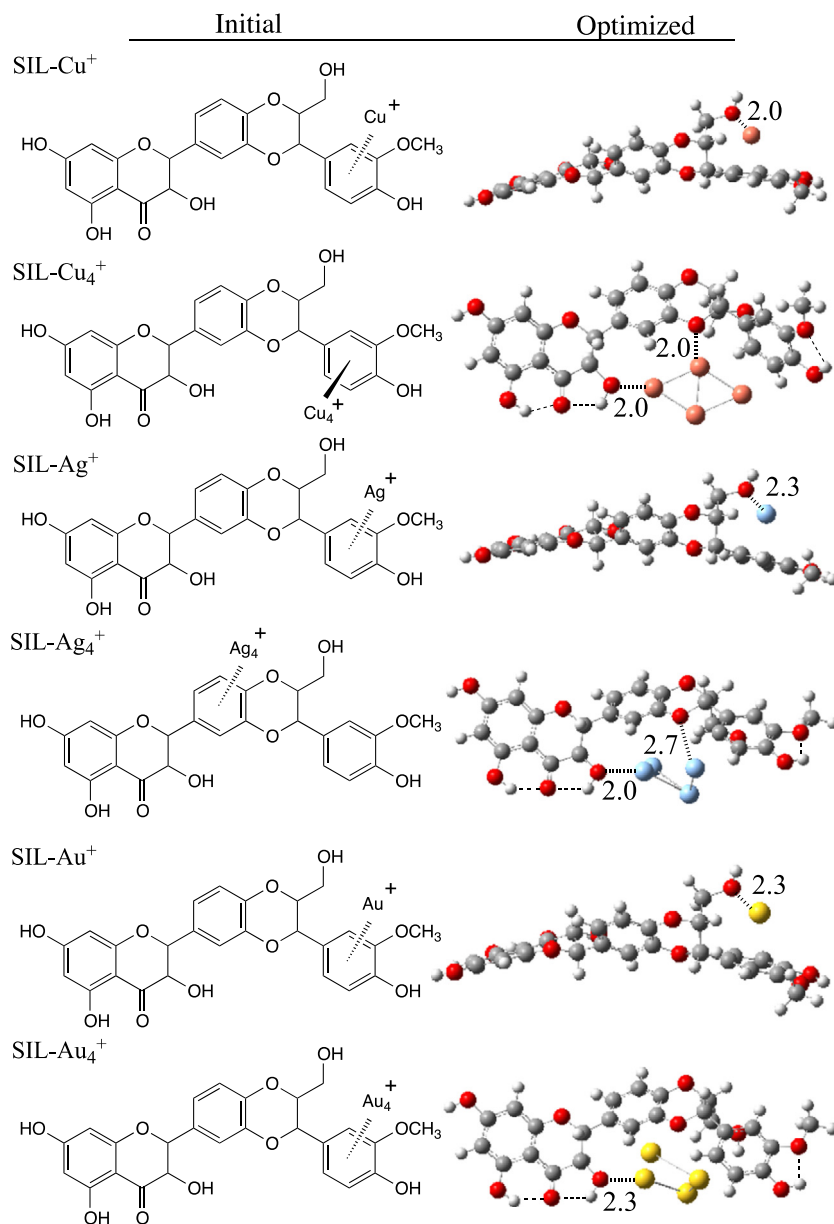


Fig. 5. Schematic initial structure and most stable optimized structures of $[\text{SIL-M}_x]^+$ (M = Cu, Ag and Au; x = 1 or 4).

molecule. It is important to note that no polarization of the molecule occurs and therefore, the molecular charge distribution remains unperturbed through the external test charge. Red colour of the Molecular Electrostatic Potential is the negative section of the molecule and the blue one is positive (low electron density).

3. Results and discussion

3.1. Geometry optimization

Several initial geometries were used to analyze the ground state structures of metal atoms and clusters interacting with SIL. Fig. 3 reports the schematic representation of the initial geometries for SIL interacting with metal atoms and clusters (neutral and cationic systems). The main reason for studying the interaction of SIL with a single metal atom is to investigate whether this atom modifies the Raman spectra and how the free radical scavenging properties of SIL change due to the presence of metals. We also include the tetramer because there are studies that define Ag_4 as the minimum cluster size for producing the latent image of a picture, [46] when AgNO_3 was used in photography. Apparently, four is the minimum number of metal atoms in a metal cluster that are able to modify physicochemical properties in an interesting way.

In Fig. 4, the most stable optimized structures for SIL and SIL-M_x are reported. For each ground state, we include the schematic representation of the initial geometry. During optimization, metal atoms and clusters do not always remain at the same initial position. There are other optimized structures that have similar stability (see Supplementary Material). The energy difference between the most stable structures and the next ones is less than 5 kcal/mol in some cases. Apparently, the position of the metal atoms or clusters around the SIL molecule does not modify stability. As structures with similar stability have similar properties, in the following we will focus on the most stable structures.

In Fig. 4, the most stable optimized structures are similar for systems with one metal atom. M is bonded to the same oxygen atom of SIL, and as expected Cu–O bond distance is slightly shorter than Ag–O and Au–O bond length. The most stable SIL–M compounds show the three intramolecular hydrogen bonds of SIL. For SIL–Cu, SIL–Ag and SIL–Au, there are other structures that are very close to the ground state system (reported in Supplementary Material). The energy difference between these structures is less than 5 kcal/mol so they could coexist in an experiment.

The structures of SIL-Cu_4 and SIL-Ag_4 are similar. The ground state has C–M and O–M bonds, and SIL has three intramolecular hydrogen bonds. Both stable structures have one metal atom bonded to O(3) (see Fig. 1). SIL-Au_4 deserves special attention as the most stable structure presents one gold atom forming a non-conventional hydrogen bond, and SIL has two intramolecular hydrogen bonds instead of three. Non-conventional hydrogen bonds were previously reported for gold systems and it is already known that they stabilize systems [47,48]. The H–Au bond length is 2.5 Å. There is also a bond between Au and two oxygen atoms of SIL that makes the system more stable. This is the only SIL-Au_4 structure that shows non-conventional hydrogen bonds. Comparing this structure with those that are less stable (not shown in the figure, see Supplementary Material), it is possible to see that this non-conventional hydrogen bond stabilizes the system by 2.5 kcal/mol.

The cations were also optimized in order to investigate the influence of the charge. Fig. 5 reports the most stable optimized structures for $[\text{SIL-M}_x]^{+1}$ (M = Cu, Ag or Au; x = 1 or 4) and the corresponding schematic structures of the initial geometries. In Fig. 5, it is evident that the most stable structures of $[\text{SIL-M}_x]^{+1}$ are those where a metal atom is bonded to O(23) (see Fig. 1). $[\text{SIL-M}]^+$ bond lengths are shorter than SIL–M bond distances and as expected,

Cu–O length is shorter than Ag–O and Au–O bond distances. The cationic structures present much larger differences in energy values between the most stable compound and the second one (Supplementary Material). Analyzing the cationic systems with clusters, structures with metal atoms bonded to oxygen atoms of SIL are the most stable systems. Fig. 5 shows all structures with three intramolecular hydrogen bonds of SIL. For the $[\text{SIL-Ag}_4]^+$ and $[\text{SIL-Au}_4]^+$ structures, clusters are no longer planar but tetrahedral, whereas in $[\text{SIL-Cu}_4]^+$ the cluster remains planar.

As already explained in the introduction, a considerable amount of de-protonated silybin ($[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$) exists under physiological conditions. SIL is used for the treatment of diseases under physiological conditions and therefore it may be that both molecules have an effect. For this reason, the investigation of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ interacting with metal atoms and clusters is important. In order to define initial geometries, the Molecular Electrostatic Potential of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ was analyzed and is shown in Fig. 6.

As anticipated, in Fig. 6 the negative region of the molecule (red colour) is close to the de-protonated oxygen atom. It is clear that the interaction with metal atoms and clusters, neutrals and cations, will most probably be with this oxygen atom. We tested other initial geometries but they optimized to less stable structures and are thus not included in this report. The most stable optimized structures for $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ interacting with metal atoms and clusters (neutral and cations) are reported in Fig. 7. In Fig. 7, the terms “anionic” and “neutral” corresponds to the charge of the system.

These optimized structures present the same M–O bond. The bond distances are shorter for the cations than for the neutrals in all systems, and in all the optimized structures, the three intramolecular hydrogen bonds of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ remain. Slight deformations of clusters can also be observed but they are all planar structures.

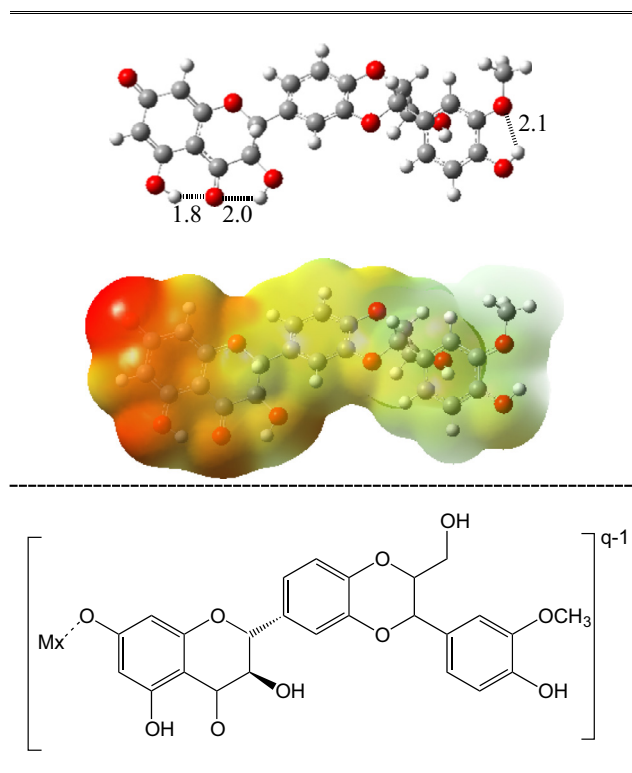


Fig. 6. Most stable structure of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ and its Molecular Electrostatic Position are reported. Schematic representation of the initial geometry for $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_x]^{q-1}$ (M = Cu, Ag or Au; x = 1 or 4; q = 0 or 1) is also included.

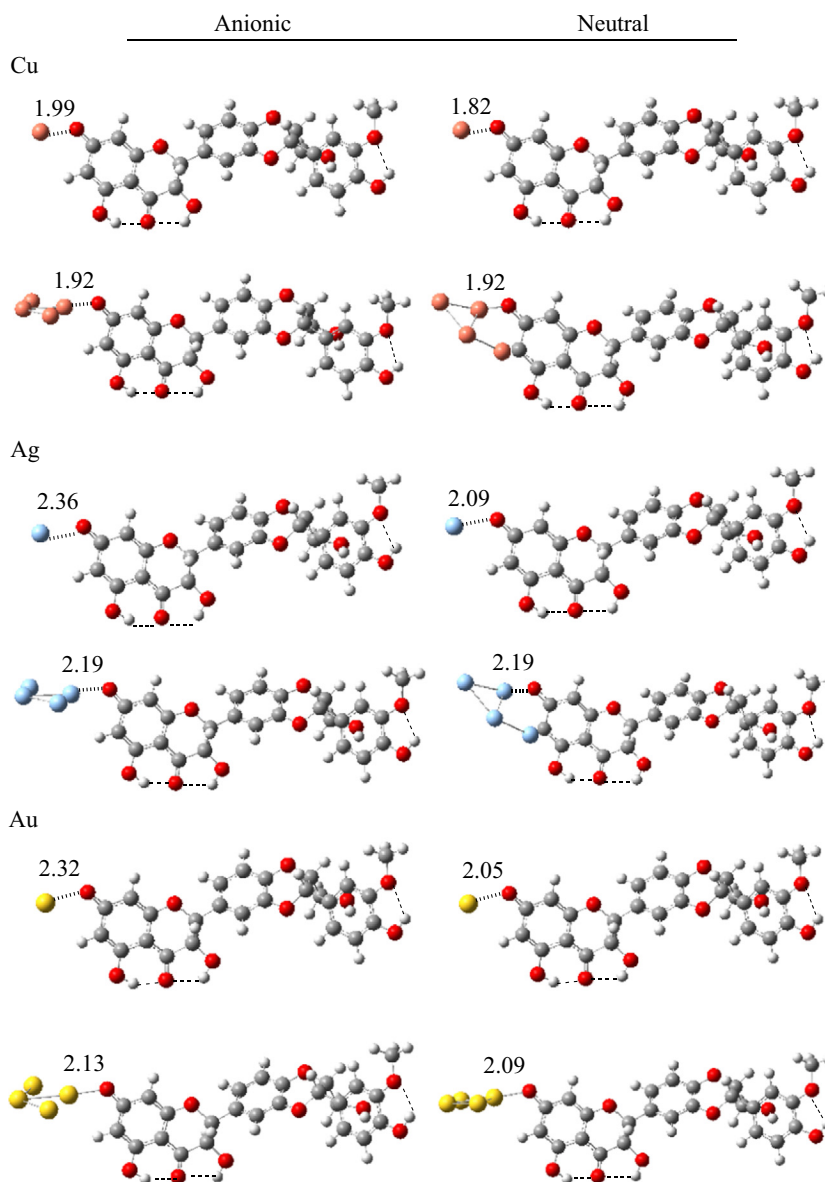


Fig. 7. Most stable structures of $[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{M}_x}]^{q-1}$ ($\text{M} = \text{Cu, Ag or Au}$; $x = 1 \text{ or } 4$; $q = 0 \text{ or } 1$).

ΔG binding energies for all systems are reported in Table 1. All SIL reactions with metal atoms and clusters are exergonic, and the reaction with clusters is more exergonic than that with atoms. Comparing SIL with $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, the latter are more exergonic than the former and the interactions between charged species are more spontaneous. Cu systems present more negative values than Ag and Au in all systems and therefore the reaction is more spontaneous with this metal.

3.2. Raman spectra

The detection of small amounts of these substances is important when they are used therapeutically. It has already been demonstrated that the presence of metals may increase the signals of the spectra [49]. Following this idea, Raman spectra for the most stable structures are shown in Figs. 8 and 9, and the main signals are reported in Tables 2 and 3, for SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, respectively. In each spectrum, typical signals for each system are indicated with a star and Tables 2 and 3 summarize the main differences. With one metal atom interacting with SIL, a difference is already

apparent. The spectra of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ are less intense than the spectra with metal atoms. A single metal atom produces signals that are not present when metals are absent. There is a signal

Table 1

Bonding energies ΔG (kcal/mol) for the following scheme reactions: $\text{M}_x^q + \text{SIL} \rightarrow \text{SIL}-\text{M}_x^q$ and $\text{M}_x^q + [\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{M}_x}]^{q-1}$ (M is Cu, Ag or Au, x is 1 or 4 and q is 0 or +1).

Molecule	ΔG (kcal/mol)	Molecule	ΔG (kcal/mol)
SIL-Cu	-7.4	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Cu}}]^{-1}$	-15.7
SIL-Cu ⁺	-81.8	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Cu}}]^0$	-148.2
SIL-Cu ₄	-20.7	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Cu}_4}]^{-1}$	-31.1
SIL-Cu ₄ ⁺	-52.6	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Cu}_4}]^0$	-124.7
SIL-Ag	-2.8	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Ag}}]^{-1}$	-8.0
SIL-Ag ⁺	-54.4	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Ag}}]^0$	-124.8
SIL-Ag ₄	-11.9	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Ag}_4}]^{-1}$	-22.6
SIL-Ag ₄ ⁺	-34.2	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Ag}_4}]^0$	-103.5
SIL-Au	-2.7	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Au}}]^{-1}$	-10.8
SIL-Au ⁺	-71.0	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Au}}]^0$	-146.4
SIL-Au ₄	-18.3	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Au}_4}]^{-1}$	-30.2
SIL-Au ₄ ⁺	-47.9	$[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{Au}_4}]^0$	-113.5

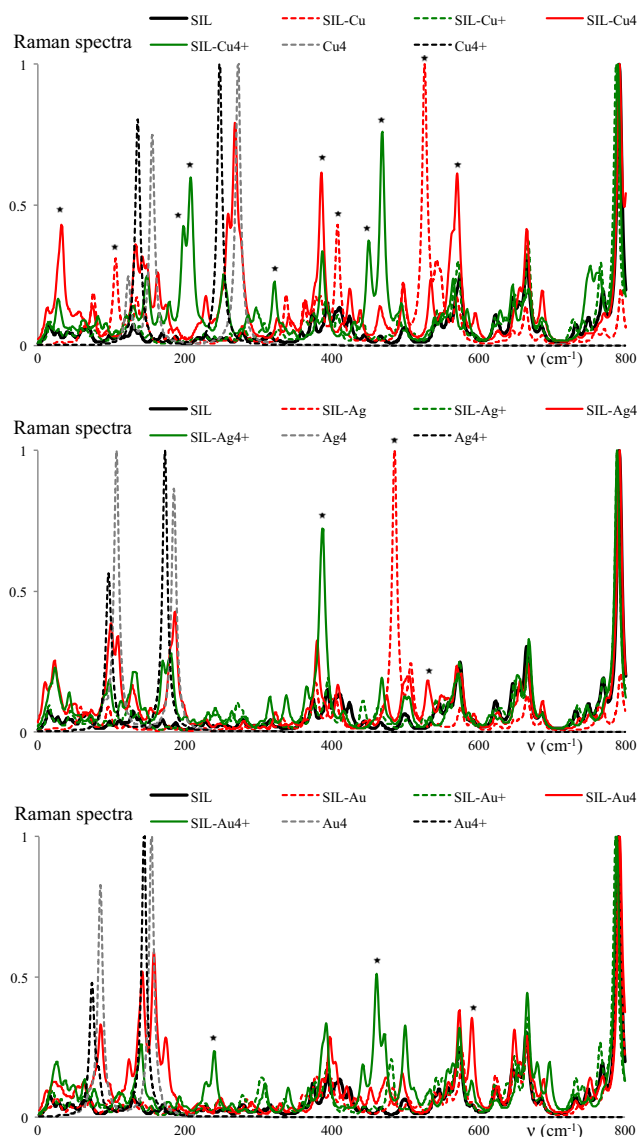


Fig. 8. Raman spectra of SIL-M_x and SIL-M_x^{q-1} ($M = \text{Cu, Ag or Au; } x = 1 \text{ or } 4$). The main different data are also included.

at 343 cm^{-1} for $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ that disappears when metal atoms and clusters are present. Other differences of the spectra due to the presence of metal clusters are indicated in the figures.

If we compare the systems with Cu, Ag and Au, it is evident that all metals produce more or less the same effects. An increment in signals due to the presence of the metals occurs in all systems, and there are some peaks that are typical. Therefore, it is possible to conclude that this is useful for detecting the existence of metals. These results are crucial, as they indicate that the presence of a very small concentration of metals may increase the signals in such a way that detection is more precise and sensitive.

3.3. Electron transfer mechanism

Figs. 10 and 11 report the FEDAM for the systems with metal atoms and with metal clusters, respectively. Three free radicals ($\cdot\text{OOH}$, NO_2 , $\text{DPPH}\cdot$) are included for comparison. The electrons will be transferred from the systems located down to the left to those placed up to the right. In general, the presence of metals (atoms and clusters) produces changes in I and A . I decreases in most cases, making these systems better electron donors than SIL or $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$.

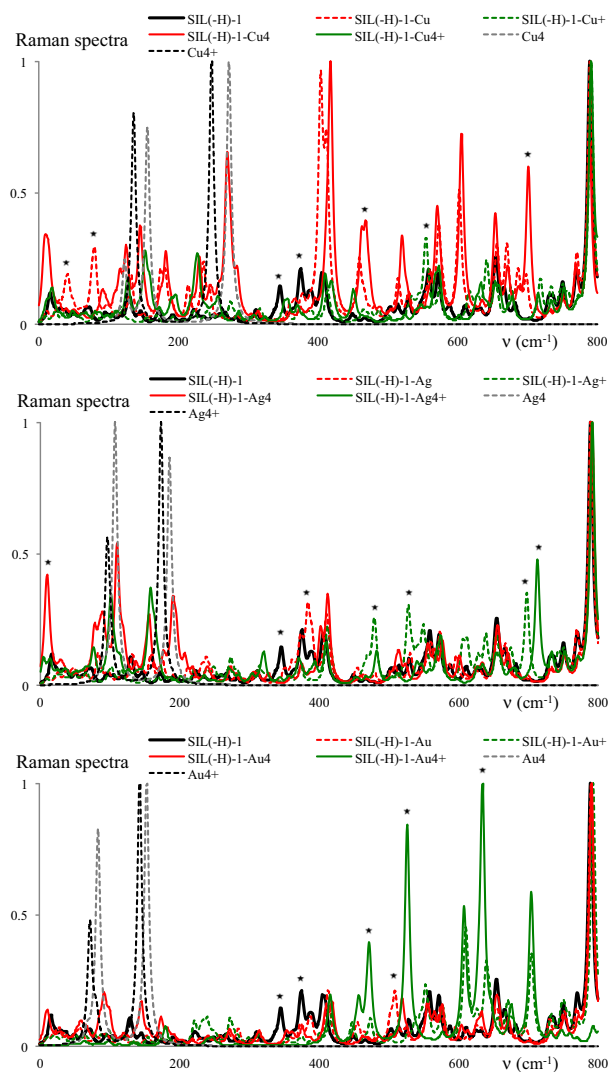


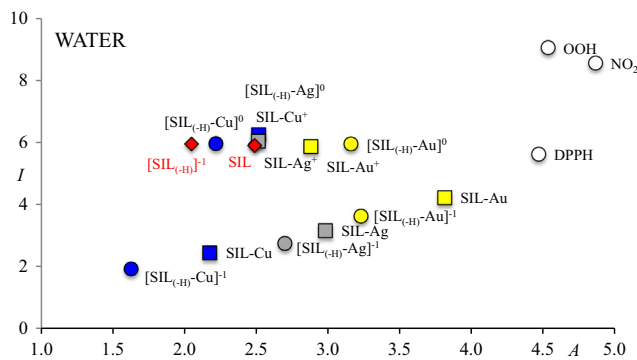
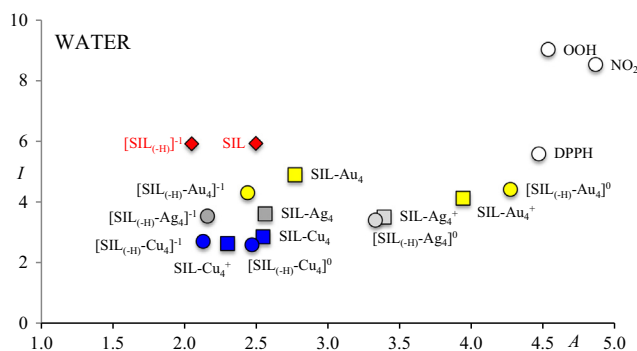
Fig. 9. Raman spectra of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})-\text{M}_x}]^{q-1}$ ($M = \text{Cu, Ag or Au; } x = 1 \text{ or } 4$; $q = 0 \text{ or } 1$). The main different data are also included.

Table 2
Main Raman spectra signals of SIL-M_x and SIL-M_x^{q-1} ($M = \text{Cu, Ag or Au; } x = 1 \text{ or } 4$).

System	ν (cm^{-1})
SIL	Less intense spectrum
SIL-Cu_x^q	
SIL-Cu	105, 407, 526
SIL-Cu^+	–
SIL-Cu_4	31, 385, 570
SIL-Cu_4^+	197, 207, 320, 449, 468
Cu_4 and Cu_4^+	All important signals smaller than 300 cm^{-1}
SIL-Ag_x^q	
SIL-Ag	485
SIL-Ag^+	–
SIL-Ag_4	528
SIL-Ag_4^+	386
Ag_4 and Ag_4^+	All important signals smaller than 200 cm^{-1}
SIL-Au_x^q	
SIL-Au	–
SIL-Au^+	–
SIL-Au_4	590
SIL-Au_4^+	238, 460
Au_4 and Au_4^+	All important signals smaller than 200 cm^{-1}

Table 3Main Raman spectra signals of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_x]^{q-1}$ ($\text{M} = \text{Cu, Ag or Au}$; $x = 1$ or 4 ; $q = 0$ or 1).

System	ν (cm^{-1})
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$	Less intense spectrum, 343, 373
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_x]^q$	
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}]^{-1}$	38, 77
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}]^0$	553
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^{-1}$	462, 701
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^0$	–
Cu_4 and Cu_4^+	All important signals smaller than 300 cm^{-1}
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_x]^q$	
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}]^{-1}$	382
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}]^0$	478, 527, 697
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]^{-1}$	9
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]^0$	712
Ag_4 and Ag_4^+	All important signals smaller than 200 cm^{-1}
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_x]^q$	
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}]^{-1}$	519
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}]^0$	–
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]^{-1}$	–
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]^0$	471, 526, 634
Au_4 and Au_4^+	All important signals smaller than 200 cm^{-1}

**Fig. 10.** FEDAM for SIL , $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, $[\text{SIL}\text{-M}]^q$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}]^{q-1}$ ($\text{M} = \text{Cu, Ag or Au}$; $q = 0$ or 1). Free radicals are included for comparison.**Fig. 11.** FEDAM for SIL , $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, $[\text{SIL}\text{-M}_4]^q$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{q-1}$ ($\text{M} = \text{Cu, Ag or Au}$; $q = 0$ or 1). Free radicals are included for comparison.

Electron acceptor capacity is increased in some cases (A is larger than for SIL or $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$) but this is not a general pattern. Notably, the presence of only one metal atom modifies electron donor acceptor capacity and thus the reactivity of the systems. Two free radicals, $\cdot\text{OOH}$ and NO_2 are the best electron acceptors. To scavenge these free radicals, the systems must be good electron donors. $\text{DPPH}\cdot$ is also a good electron acceptor and all good electron donors are able to scavenge this free radical. The best electron donor

systems are compounds of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ with Cu (atom and cluster); thus these are the best free radical scavenger molecules. The best electron acceptors are systems with Au , which are thus the best free radical scavenger molecules for free radicals that accept electrons such as O_2^- (not shown in figure, see Ref. [50]). In summary, the presence of metals (atoms and clusters) modifies the electron transfer capacity of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. This may constitute an advantage for therapeutic purposes, but it is clear that further research is necessary. The therapeutic properties of these molecules may be related to their electron transfer properties, as the electron transfer represents one of the antiradical (or free radical scavenger) mechanisms. If this is so, then the metal atoms and clusters may produce an increment in the protective actions of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. More studies about the relationship between the electron transfer capacity and the therapeutic efficiency of SIL or $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ interacting with metal atoms and clusters are necessary.

3.4. Molecular electrostatic potential

Molecular Electrostatic Potential enables us to analyze the regions of the molecules that are positively (blue) or negatively (red) charged and therefore more susceptible to nucleophilic or electrophilic additions. Figs. 12 and 13 present the Molecular Electrostatic Potential for Cu_4 interacting with SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. Results with other metals and clusters are not included as they are similar. Comparing the Molecular Electrostatic Potential for the neutral systems, it is possible to see that they are very similar to the Molecular Electrostatic Potential of the SIL (Fig. 12 two first structures). The presence of Cu_4 does not alter the charge distribution of the molecule and the same reactivity can be expected. However, the presence of the cationic clusters modifies the Molecular Electrostatic Potential of SIL (Fig. 12, third structure). The positive section of the molecule is located close to the cationic cluster. Therefore, reactivity could be different. Similar charge distribution is found with $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^0$ (Fig. 13, third structure) The positive charge is located on the cluster and the negative section is less negative in comparison with $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. The presence of the cationic cluster modifies the charge distribution all over the molecule and this may alter not only reactivity, but also biological activity.

4. Concluding remarks

The most stable Cu , Ag and Au structures of atoms and metallic clusters interacting with SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ are presented. ΔG binding energies show that all systems are thermodynamically spontaneous, and in this way charged systems are more favourable than neutral systems. The Raman spectra are useful for identifying the different systems, as the presence of metal atoms and clusters produce substantial changes, enhancing signals of the SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ spectra. Almost every system has typical signals in the Raman spectra, making characterization possible. Moreover, it is feasible to distinguish between SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$.

The electron transfer mechanism is important for scavenging free radicals. The presence of metals increases the electron transfer capacity of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$, also increasing antiradical capability. SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ scavenge free radicals but the compounds formed with SIL or $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ and metals are better electron donor-acceptor compounds and therefore, better free radical scavengers.

The Molecular Electrostatic Potential of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ are not altered by the presence of neutral clusters, but the interactions with cationic clusters modify charge distribution and probably reactivity. This may be important for therapeutic purposes. Further research is required to discern whether or not SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$

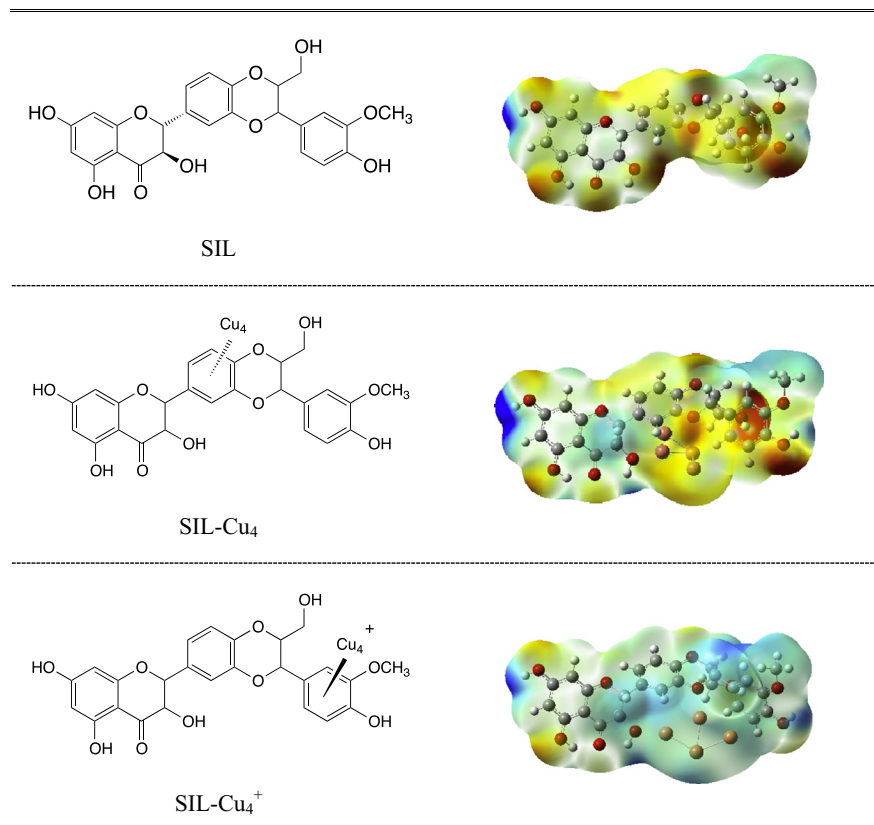


Fig. 12. SIL, SIL-Cu₄ and SIL-Cu₄⁺; schematic representation of the structure and Molecular Electrostatic Potential.

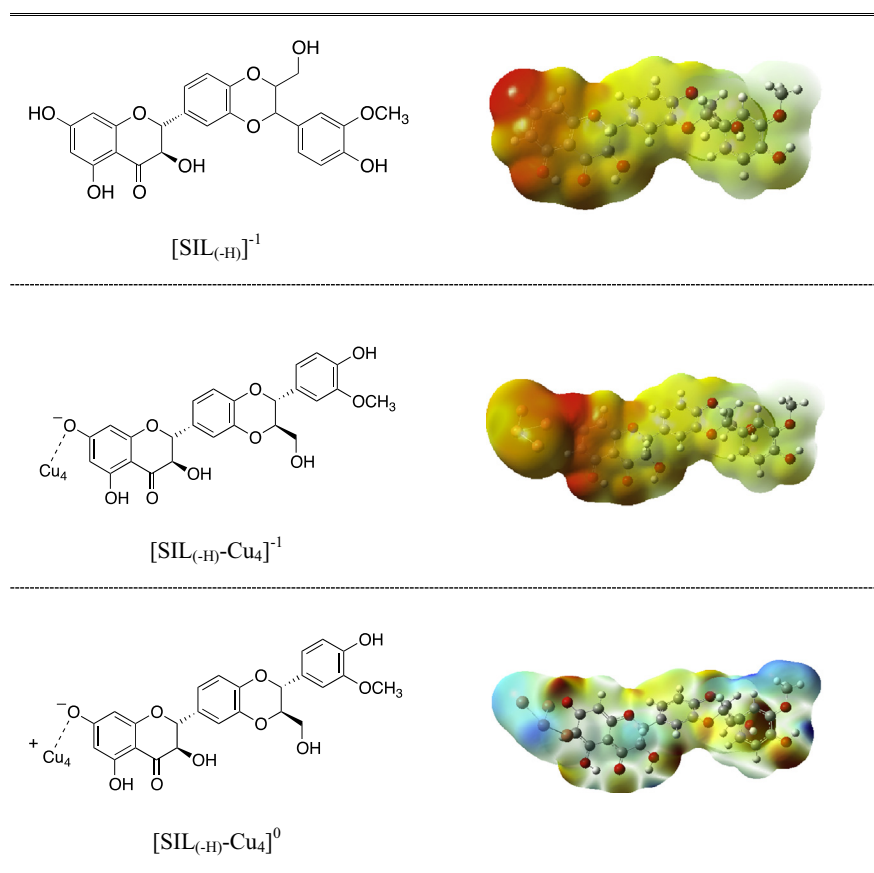


Fig. 13. Schematic representation of the structure and Molecular Electrostatic Potential.

- [44] A. Martínez, M.A. Rodríguez-Gironés, A. Barbosa, M. Costas, Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 9037–9042.
- [45] A. Martínez, R. Vargas, A. Galano, What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on Electron Transfer Reactions between carotenoids and free radicals, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 12113–12120.
- [46] T. Leisner, C. Rosche, S. Wolf, F. Granzer, L. Woste, The catalytic role of small coinage-metal clusters in photography, *Surf. Rev. Lett.* 3 (1996) 1105.
- [47] R. Vargas, A. Martínez, Non-conventional hydrogen bonds: pterins-metal anions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 12775–12784.
- [48] A. Martínez, R. Vargas, Electron donor-acceptor properties of metal atoms interacting with pterins, *New J. Chem.* 34 (2010) 2988–2995.
- [49] V. Bonačić-Koutecký, A. Kulesza, L. Gell, R. Mitrić, A.F. Bertorelle, R. Hamouda, D. Rayane, M. Broyer, T. Tabarin, P. Dugourd, Silver cluster–biomolecule hybrids: from basics towards sensors, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 9282–9290.
- [50] A. Galano, R. Vargas, A. Martínez, Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 193–200.



Silybin interacting with Cu₄, Ag₄ and Au₄ clusters: Do these constitute antioxidant materials?



Miguel Reina*, Ana Martínez

Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S.N. Ciudad Universitaria, P.O. Box 70-360, Coyoacán, C.P. 04510 Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2017

Received in revised form 24 March 2017

Accepted 26 March 2017

Available online 31 March 2017

Keywords:

Free radicals scavengers

Metal-organic systems

Hydrogen atom transfer

Radical adduct formation

ABSTRACT

We analyze the free radical scavenger capacity of silybin-metal clusters systems by applying Density Functional Theory (DFT) calculations, following two well-known antioxidant mechanisms: the radical adduct formation (RAF) and the hydrogen atom transfer (HAT). As apparent in this investigation, the presence of tetramer clusters increases the antioxidant capacity of silybin and de-protonated silybin. In order to assess further antiradical processes, we also investigated the single electron transfer (SET) process (for the most stable structures derived from RAF and HAT mechanisms). From this study, we concluded that the presence of Cu₄, Ag₄ and Au₄ clusters enhances the free radical scavenging properties of silybin and de-protonated silybin. These metal-organic systems may serve as effective antioxidant materials. These results may provide encouraging guidance for those involved in these experiments and hold promise for future applications.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The interaction of metal atoms and clusters to enhance optical, electrical and spectroscopic properties of molecules is an area of active research [1–8]. These coupled systems may serve to produce sensitive biosensors and new antioxidant materials [5]. The presence of metal atoms may have multiple benefits, for example, it is possible to increase the limits for detecting several organic substances that are attached to the metal systems.

Polyphenols comprise a large family of organic molecules that bestow significant beneficial properties [9–14], which correlate strongly with their antioxidant activity. Likewise, they are able to deactivate free radical molecules and retard oxidative stress, using diverse mechanisms [15]. Among polyphenols, silybin (SIL) is a well-documented natural compound that manifests powerful antioxidant activity [16–40]. SIL is the main component of silymarin; a natural mixture that is extracted from the *Silybum marianum* (milk thistle) plant [41].

Previously, we reported that interaction of SIL with Cu, Ag and Au single atoms and tetramer clusters enhances the Raman spectra signal. Our investigation concerning the single electron transfer (SET) process indicates that the capacity to either donate or accept electrons also increases when metal clusters interact with this molecule [5], possibly indicating that these systems are good

antioxidants. In spite of all the studies that focus on the properties of SIL interacting with metal atoms and clusters, only SET has been implemented to analyze the effect of metal clusters on the antioxidant properties of these polyphenol substances. It therefore seems appropriate to study other free radical scavenger mechanisms, to analyze whether these coupled systems constitute good antioxidant materials.

This work aims to study the free radical scavenger capacity of compounds formed from metal clusters and SIL. Under physiological conditions (pH = 7.4) SIL co-exists with the de-protonated [25,28] form ([SIL_(-H)]⁻¹), thus we also investigate the interaction between metal clusters and ([SIL_(-H)]⁻¹). Two principal mechanisms for scavenging [42–44] free radicals are studied: the radical addition formation (RAF) and the hydrogen atom transfer (HAT). It is well known that polyphenol molecules such as SIL, mainly use these mechanisms for scavenging free radicals [45]; however as far as we know, there are no investigations concerning SIL attached to metal clusters. Principally, the idea is to analyze whether the presence of metal clusters increases the antioxidant properties of SIL and [SIL_(-H)]⁻¹. We also investigated the SET mechanism for the most stable structures derived from RAF and HAT, in order to examine further antiradical processes. In the following, it becomes apparent that SIL and [SIL_(-H)]⁻¹ showed better antioxidant capacity when attached to Cu₄, Ag₄ and Au₄, than they did as bare molecules. These results may serve as an encouraging guide for researchers and may have potential applications.

* Corresponding author.

E-mail address: mreina.2404@hotmail.com (M. Reina).

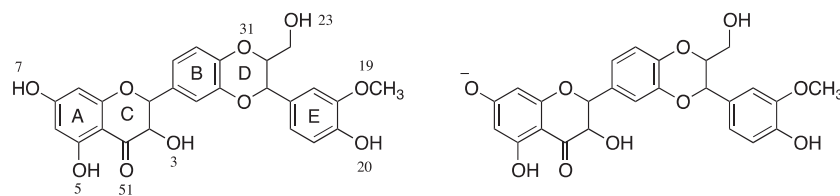


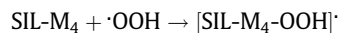
Fig. 1. Silybin (SIL) and de-protonated silybin ($[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$).

2. Computational details

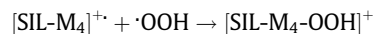
Gaussian 09 code [46] was employed to optimize geometries and analyzed the electronic properties of SIL-M_4 and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4$ ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Ag}$ and Au) systems. The interaction with different free radical molecules is also analyzed with the same methodology. Fig. 1 reports a schematic representation of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ with conventional numbering and labels.

Initial geometries were fully optimized at M06/LANL2DZ level of theory in gas phase [47–54]. All coupled systems were optimized as singlets or doublets. In order to verify optimized minima, we performed harmonic analysis and we identified local minima (zero imaginary frequencies). To study the RAF mechanism, several initial geometries were analyzed. The $\cdot\text{OOH}$ was bonded to every carbon atom forming double bonds, and also to the metal atoms of the clusters. The RAF mechanism was studied according to the following reaction schemes. M represents Cu, Ag or Au in all cases:

For SIL



$$\cdot G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^{\cdot}) - G(\text{SIL-M}_4) + G(\cdot\text{OOH})$$



$$\cdot G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^{+\cdot}) - G([\text{SIL-M}_4]^{+\cdot}) + G(\cdot\text{OOH})$$

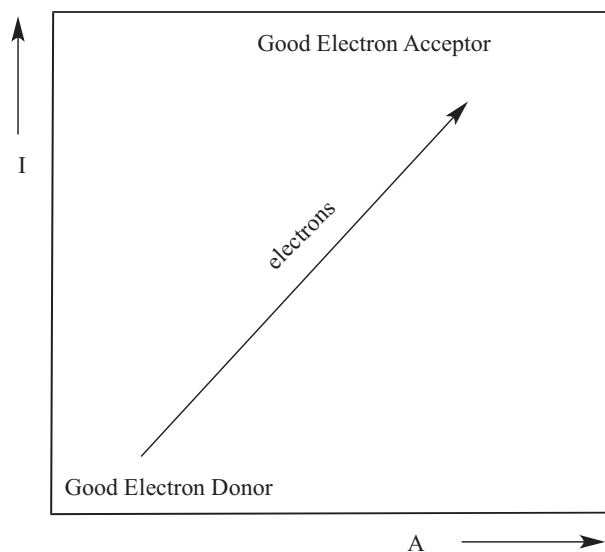
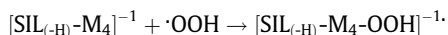


Fig. 2. Full Electron Donor-Acceptor Map (FEDAM).

For $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$



$$\cdot G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{-1\cdot}) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}) + G(\cdot\text{OOH})$$

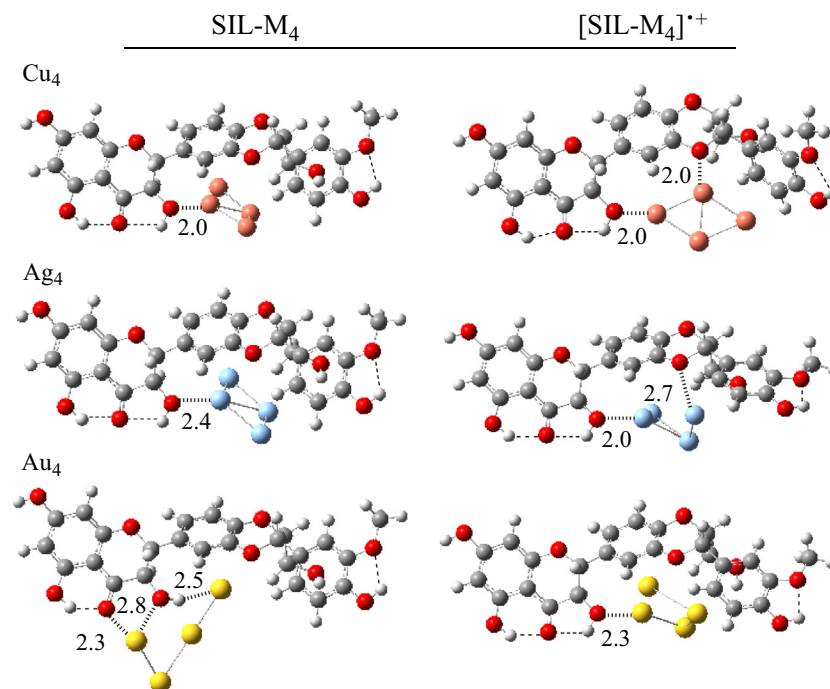


Fig. 3. Most stable structures of SIL-M_4 and $[\text{SIL-M}_4]^{+\cdot}$ ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Ag}$ or Au).

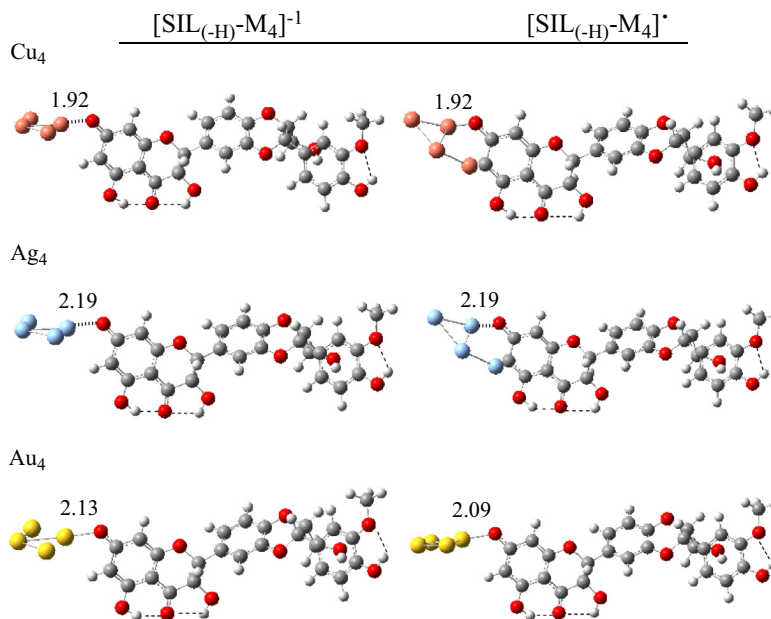


Fig. 4. Most stable structures of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{\bullet}$ ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Ag}$ or Au).

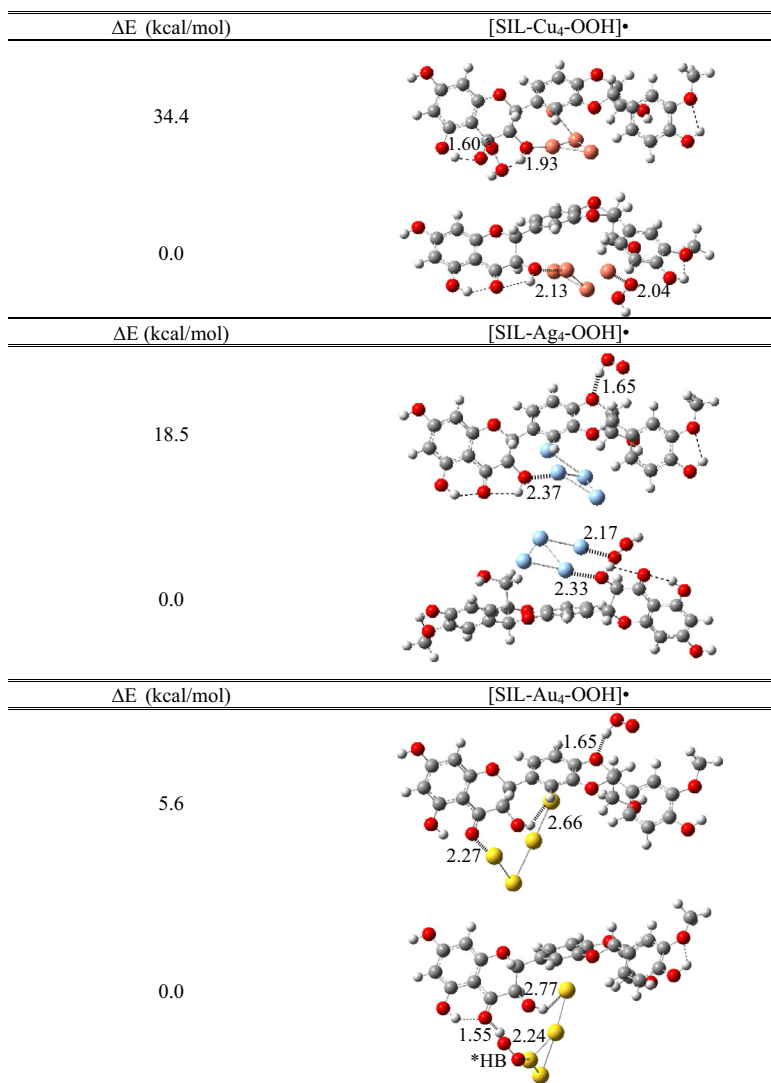
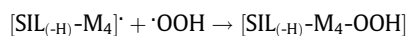


Fig. 5. Most stable structures of $[\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^{\bullet}$ ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Ag}$ or Au).

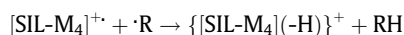


$$\cdot G_{\text{RAF}} = G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}] - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{\cdot}) + G(\text{OOH}))$$

The HAT mechanism is analyzed in terms of the Gibbs free energy (ΔG_{HAT}) obtained as follows for SIL and for $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$:



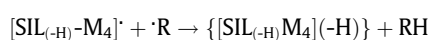
$$\cdot G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL-M}_4](-\text{H})\}^{\cdot}) + G(\text{RH}) - G(\text{SIL-M}_4) - G(\cdot\text{R})$$



$$\cdot G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL-M}_4](-\text{H})\}^{+}) + G(\text{RH}) - G([\text{SIL-M}_4]^{+}) + G(\cdot\text{R})$$



$$\cdot G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{M}_4](-\text{H})\}^{-1}) + G(\text{RH}) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}) + G(\cdot\text{R})$$



$$\cdot G_{\text{HAT}} = G(\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{M}_4](-\text{H})\}) + G(\text{RH}) - G([\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{\cdot}) - G(\cdot\text{R})$$

M is Cu, Ag or Au, $\{[\text{SIL-M}_4](-\text{H})\}^{\cdot}$ and $\{[\text{SIL-M}_4](-\text{H})\}^{+}$ are the dehydrogenated systems from SIL, $\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4](-\text{H})\}^{-1}$ and $\{[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4](-\text{H})\}$ are the dehydrogenated systems from $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. R \cdot is the free radical ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$, NO_2 and $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$) and RH is the free radical bonded to one hydrogen atom (H_2O , H_2O_2 , HNO_2 and $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$).

The products of the most exergonic reactions coming from both mechanisms were selected to analyze the SET mechanism *i.e.* the capability to either donate or accept an electron. To investigate the SET mechanism, the vertical ionization energy (I) and the vertical electron affinity (A) were obtained from single point calculations of cationic and anionic molecules, using the optimized structure of the neutrals at M06/6-311+g(d,p)/LanL2DZ level of theory. Water was included to simulate polar environment using the SMD continuum model [55]. FEDAM (Full Electron Donor-Acceptor Map) is a previously reported visual tool [56,57]. In this map (see Fig. 2) I and A are plotted and allow us to classify substances as either donors or acceptors of electrons. Electrons will be transferred from molecules located down to the left of the map (good electron donors) to those molecules that are up to the right (good electron acceptors).

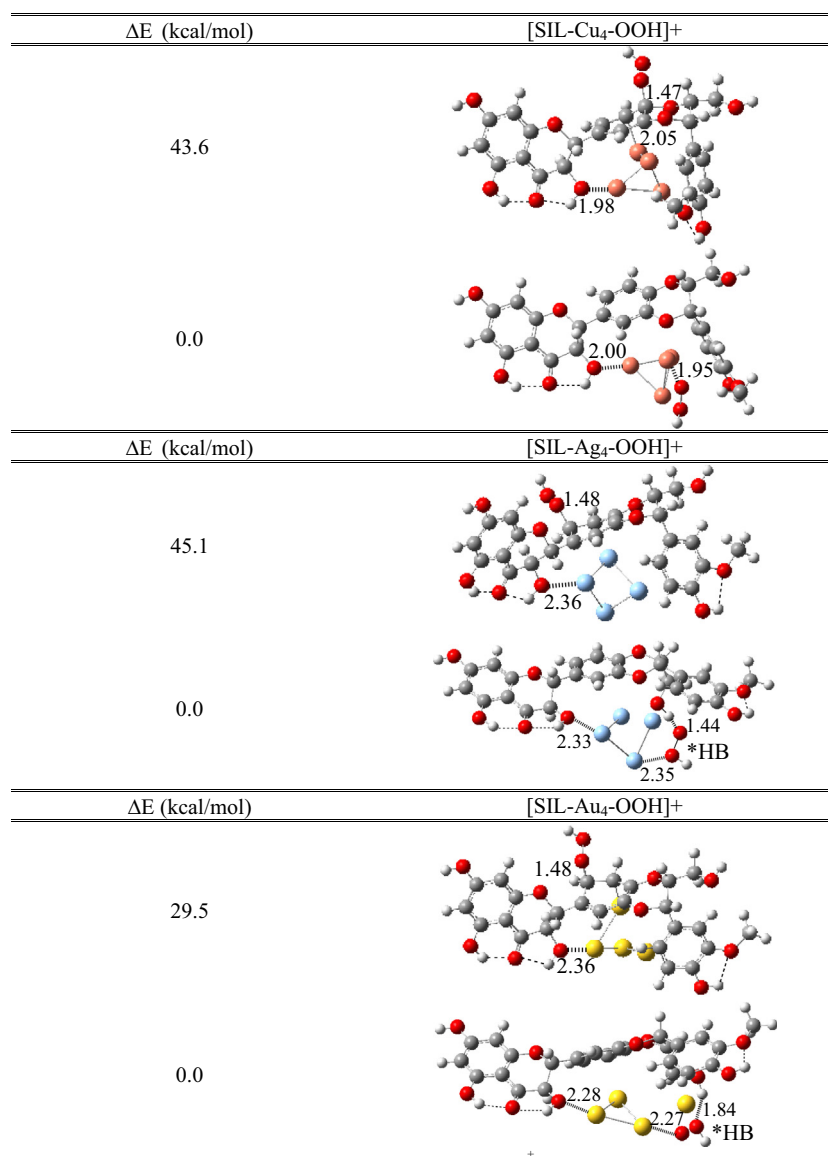


Fig. 6. Most stable structures of $[\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^{+}$ (M = Cu, Ag or Au).

3. Results and discussion

3.1. Geometry optimization

The most stable structures of SIL-M_4 and $[\text{SIL-M}_4]^+$ were reported previously [5]. They are presented in Fig. 3 for easy reference. In all the structures, metal clusters are located near to C and B rings. As expected, distances are shorter for Cu than for Ag and Au clusters; and for charged systems, distances are shorter than for neutral ones.

Fig. 4 reports the most stable optimized geometries for $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]^{-1}$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4]$. The acid proton in SIL corresponds to OH(7) (see Fig. 1). Therefore in this position, the most stable structures correspond to the interaction between de-protonated SIL and metal clusters. Other geometries were previously reported as less stable [5]. The structures of Fig. 3 and 4 are the reactants for the RAF and the HAT mechanisms.

3.2. Radical adduct formation (RAF)

Two initial structures were used to analyze the interaction of these systems with $\cdot\text{OOH}$: bonded to all C–C double bonds of the

organic molecule or bonded directly to the metal clusters. Figs. 5–8 present the most stable optimized structures of compounds coming from the RAF mechanism.

Figs. 5 and 6 present $[\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^\cdot$ and $[\text{SIL-M}_4\text{-OOH}]^+$ systems, respectively. Energy differences compared to the most stable structures are reported. The energy difference is larger for the cationic systems than for the neutrals. It becomes clear that in all cases, the most stable geometries occur when the $\cdot\text{OOH}$ interacts directly with the metal clusters. In some of the structures ($[\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^\cdot$, $[\text{SIL-Ag}_4\text{-OOH}]^\cdot$ and $[\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^\cdot$) hydrogen bonds are also presented (indicated in the figures, $^*\text{HB}$).

Figs. 7 and 8 include the most stable optimized structures for de-protonated silybin interacting with the clusters; i.e. $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{-1}$ and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]$, respectively. Similarly, in these systems the most stable structures are those with the $\cdot\text{OOH}$ bonds to the metal clusters. In all $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{-1}$ systems (Fig. 7), the most stable structures present hydrogen bonds (indicated as $^*\text{HB}$). For the $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]$, the most stable structures are comparable, regardless of which metal forms the cluster (Fig. 8, structures located at 0.0). Metal clusters interact with O(7) of the organic molecule and $\cdot\text{OOH}$. In all cases, the $\cdot\text{OOH}$ is located between two metal atoms.

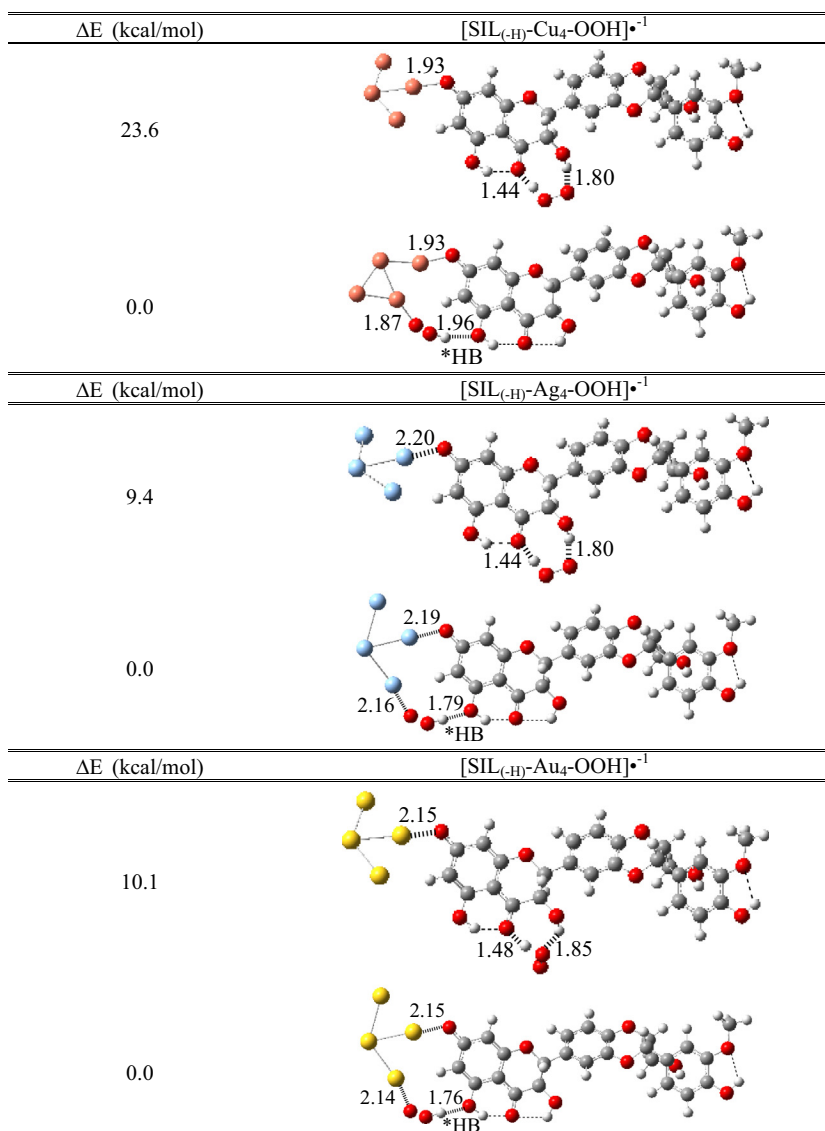


Fig. 7. Most stable structures of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]^{-1}$ ($M = \text{Cu, Ag or Au}$).

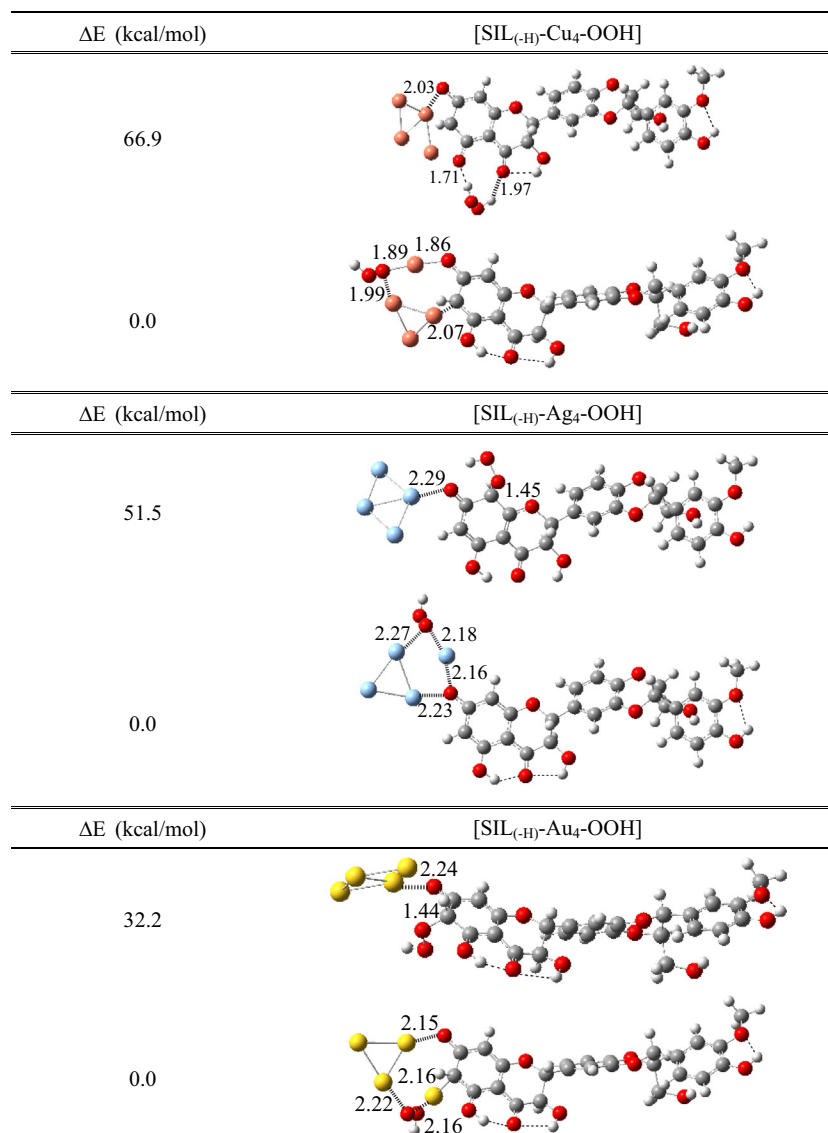


Fig. 8. Most stable structures of $[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-M}_4\text{-OOH}]$ ($M = \text{Cu, Ag or Au}$).

Table 1
Gibbs free energies (ΔG_{RAF}) considering the reactions of the RAF mechanism.

Reaction	ΔG_{RAF} (kcal/mol)
$\text{SIL} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-OOH}]^{\cdot}$	-2.8
$\text{SIL-Cu}_4 + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Cu}_4\text{-OOH}]^{\cdot}$	-45.4
$\text{SIL-Ag}_4 + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Ag}_4\text{-OOH}]^{\cdot}$	-23.0
$\text{SIL-Au}_4 + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^{\cdot}$	-3.8
$[\text{SIL-Cu}_4]^{\cdot+} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Cu}_4\text{-OOH}]^{\cdot+}$	-75.5
$[\text{SIL-Ag}_4]^{\cdot+} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Ag}_4\text{-OOH}]^{\cdot+}$	-52.0
$[\text{SIL-Au}_4]^{\cdot+} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]^{\cdot+}$	-38.5
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-OOH}]^{-1}$	-14.5
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^{-1} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4\text{-OOH}]^{-1}$	-33.0
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]^{-1} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4\text{-OOH}]^{-1}$	-19.6
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]^{-1} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4\text{-OOH}]^{-1}$	-13.3
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4]^{\cdot} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu}_4\text{-OOH}]$	-65.8
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4]^{\cdot} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Ag}_4\text{-OOH}]$	-43.8
$[\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4]^{\cdot} + \cdot\text{OOH} \rightarrow [\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Au}_4\text{-OOH}]$	-48.4

Table 1 presents Gibbs free energies for the radical adduct formation of the most stable structures. The values for the most exergonic reactions of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ without the metal clusters are

also presented for the purpose of comparison. Negative values indicate that the formation reaction is exergonic. Out of all systems that included metal clusters, Gibbs free energies are more negative than values for SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$. The presence of metal clusters may serve to promote an interesting synergic effect, which may be involved in the free radical scavenging enhancement properties of SIL. All these systems can be considered as antioxidant materials, as they exhibit exergonic capacity to stabilize $\cdot\text{OOH}$. The ability of SIL and $[\text{SIL}_{(-\text{H})}]^{-1}$ to scavenge $\cdot\text{OOH}$ through the RAF mechanism is greatly enhanced in the presence of the metal clusters. The best metal for enhancing the capacity to capture $\cdot\text{OOH}$ is Cu (greater negative values; approximately 20 kcal/mol).

3.3. Hydrogen atom transfer (HAT)

Hydrogen atom transfer is one of the main free radical scavenging mechanisms applied by polyphenols [42–44]. In order to investigate the HAT mechanism, hydrogen atoms from all the OH groups were removed one by one. Only the most stable de-hydrogenated systems are considered in what follows. The HAT mechanism was studied according to the corresponding equations. R \cdot is the free

Table 2
Gibbs free energy values (ΔG_{HAT}) considering the reactions of the HAT mechanism.

Reaction	R' =	ΔG_{HAT} (kcal/mol)			
		$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{OOH}$	NO_2	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot$
$\text{SIL} + \text{R}' \rightarrow \text{SIL}(\text{-H})\cdot + \text{RH}$		-24.0	3.8	8.3	2.7
$\text{SIL-Cu}_4 + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL-Cu}_4](\text{-H})\}\cdot + \text{RH}$		-43.3	-15.5	-11.0	-16.6
$\text{SIL-Ag}_4 + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL-Ag}_4](\text{-H})\}\cdot + \text{RH}$		-40.3	-12.5	-8.0	-13.6
$\text{SIL-Au}_4 + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL-Au}_4](\text{-H})\}\cdot + \text{RH}$		-23.6	4.2	8.7	3.1
$[\text{SIL-Cu}_4]^+ + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL-Cu}_4](\text{-H})\}^+ + \text{RH}$		-61.5	-33.7	-29.2	-34.8
$[\text{SIL-Ag}_4]^+ + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL-Ag}_4](\text{-H})\}^+ + \text{RH}$		-61.4	-33.6	-29.1	-34.7
$[\text{SIL-Au}_4]^+ + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL-Au}_4](\text{-H})\}^+ + \text{RH}$		-41.9	-14.1	-9.6	-15.2
$[\text{SIL}(\text{-H})]^{-1} + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})](\text{-H})\}^{-1} + \text{RH}$		-27.3	0.5	5.0	-0.6
$[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Cu}_4]^{-1} + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Cu}_4](\text{-H})\}^{-1} + \text{RH}$		-28.6	-0.8	3.7	-1.9
$[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Ag}_4]^{-1} + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Ag}_4](\text{-H})\}^{-1} + \text{RH}$		-26.8	1.0	5.5	-0.1
$[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Au}_4]^{-1} + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Au}_4](\text{-H})\}^{-1} + \text{RH}$		-25.0	2.8	7.3	1.7
$[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Cu}_4]^+ + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Cu}_4](\text{-H})\}^+ + \text{RH}$		-32.8	-5.0	-0.5	-6.1
$[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Ag}_4]^+ + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Ag}_4](\text{-H})\}^+ + \text{RH}$		-26.8	1.0	5.5	-0.1
$[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Au}_4]^+ + \text{R}' \rightarrow \{[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Au}_4](\text{-H})\}^+ + \text{RH}$		-25.6	2.2	6.7	1.1
	RH =	H_2O	H_2O_2	HNO_2	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$

radical ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$, NO_2 and $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}\cdot$) and RH is the free radical bonded to one hydrogen atom (H_2O , H_2O_2 , HNO_2 and $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$).

Table 2 reports ΔG_{HAT} for all systems under study. Negative ΔG_{HAT} values indicate that formation reactions are exergonic. Generally, the presence of Cu, Ag and Au tetramer clusters increases the exergonicity of the HAT mechanism compared to SIL and $[\text{SIL}(\text{-H})]^{-1}$. HAT reactions of the systems that have metal clusters attached to SIL are more exergonic than those with metal clusters attached to $[\text{SIL}(\text{-H})]^{-1}$ (greater ΔG_{HAT} negative values were found). For SIL-M_4 and $[\text{SIL-M}_4]^+$ systems, only the reaction with SIL-Au_4 with some of the free radicals is endergonic, so that these system is not capable of scavenge the four free radicals studied here.

For $[\text{SIL}(\text{-H})\text{-M}_4]^{-1}$ and $[\text{SIL}(\text{-H})\text{-M}_4]\cdot$ systems, only the reactions with $[\text{SIL}(\text{-H})\text{-Cu}_4]\cdot$ system and four free radicals are exergonic. These results suggest that HAT mechanism would be predominant under acidic conditions, if SIL is not deprotonated. For systems with Cu, antioxidant capacity is better (more exergonic reactions) than for systems with Ag and Au. In particular SIL-Cu_4 and $[\text{SIL-Cu}_4]^+$ are optimum, as the reaction with four free radicals is exergonic.

3.4. Single electron transfer (SET)

SET mechanism for the most stable structures derived from RAF and HAT is investigated in order to examine further antiradical processes. Figs. 9 and 10 present the FEDAM for the most stable systems. We are considering the products of the reaction that are generated by means of RAF (Fig. 9) and HAT (Fig. 10) mechanisms.

Fig. 9 shows that all systems containing metal cluster are better electron donors and worse electron acceptors than $[\text{SIL-OOH}]\cdot$ and $[\text{SIL}(\text{-H})\text{-OOH}]^{-1}$. The only exception is $[\text{SIL-Au}_4\text{-OOH}]\cdot$ which is the best electron acceptor among the compounds studied. It is clear that metal clusters increase the antioxidant properties. Fig. 10 presents the FEDAM for systems constituting products of HAT mechanism that present exergonic reactions. In this Figure, it is generally apparent that systems containing metal clusters are better antioxidant molecules than silybin dehydrogenated molecules $[\text{SIL}(\text{-H})\cdot]$ and $\{[\text{SIL}(\text{-H})](\text{-H})\}^{-1}$ as they have lower I values. $\{[\text{SIL-Au}_4](\text{-H})\}^+$ represents the exception.

In this regard, products from RAF and HAT structures may present interesting antiradical properties in terms of their capacity to either donate or accept electrons. The presence of copper tends to

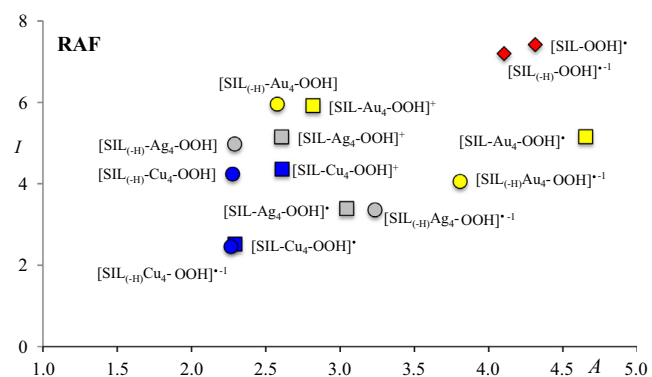


Fig. 9. FEDAM for the most stable products of the reaction according to the RAF mechanism.

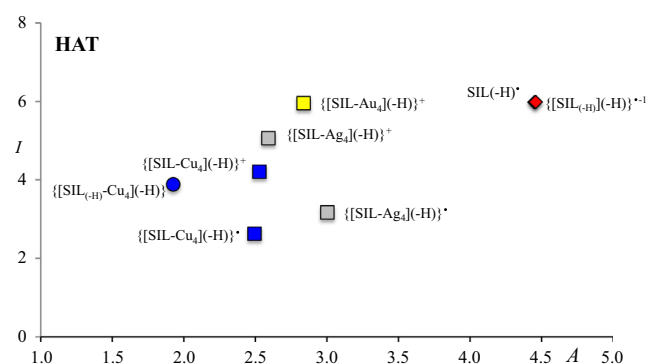


Fig. 10. FEDAM for the most stable products of the reaction according to the HAT mechanism.

increase electron donor capacity and the presence of gold augments electron acceptor ability.

4. Concluding remarks

The presence of tetramer clusters significantly enhances the free radical scavenging properties of SIL and $[\text{SIL}(\text{-H})]^{-1}$, when applying RAF and HAT mechanisms. In particular, copper systems showed the best free radical scavenging properties.

The FEDAM for the most stable structures derived from RAF and HAT reactions indicates that the presence of tetramer metal clusters increases the capability to donate an electron. The presence of copper generally increases electron donor capacity and the presence of gold augments electron acceptor ability.

These metal-organic coupled systems may represent promising antiradical materials. These results may provide encouraging guidance for those involved in these experiments and hold promise for future applications.

Acknowledgements

This study was funded by DGAPA-PAPIIT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and resources provided by the Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM). This work was carried out using a NES supercomputer, provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We would like to thank the DGTIC of UNAM for their excellent and free supercomputing services and Caroline Karlslake (Masters, Social Anthropology, Cambridge University, England) for reviewing the grammar and style of the text in English. The authors would like to acknowledge Oralia L Jiménez A., María Teresa Vázquez, Alberto López Vivas and Caín González for their technical support. MR thanks CONACyT for the PhD scholarship (387687).

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for profit sectors.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2017.03.034>.

References

- Z. Sanader, R. Mitrić, V. Bonačić-Koutecký, B. Bellina, R. Antoine, P. Dugourd, The nature of electronic excitations at the metal-bioorganic interface illustrated on histidine-silver hybrids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2012) 1257–1261.
- E. Katz, I. Willner, Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties and applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 6042–6108.
- V. Bonačić-Koutecký, A. Kulesza, L. Gell, R. Mitrić, A.F. Bertorelle, R. Hamouda, D. Rayane, M. Broyer, T. Tabarín, P. Dugourd, Silver cluster biomolecule hybrids: from basics towards sensors, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 9282–9290.
- N.T.T. An, D.Q. Dao, P.C. Nam, B.T. Huy, H.N. Tran, Surface enhanced Raman scattering of melamine on silver substrate: an experimental and DFT study, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. and Biomol. Spectr.* 169 (2016) 230.
- M. Reina, A. Martínez, How the presence of metal atoms and clusters can modify the properties of Silybin? A computational prediction, *Comput. Theor. Chem.* 1099 (2017) 174–184.
- R.E. Palmer, C. Leung, Immobilisation of proteins by atomic clusters on surfaces, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 48–55.
- B. Sharma, R.R. Frontiera, A.I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne, SERS: materials, applications, and the future, *Mater. Today* 15 (2012) 16.
- L. Shang, S. Dong, G.U. Nienhaus, Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications, *Nano Today* 6 (2011) 401–418.
- H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani, R. Rezaee, M. Iranshahi, Antioxidant and anti-inflammatory properties of citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an update review of their molecular mechanism and experimental models, *Phytother. Res.* 29 (2015) 323–331.
- P. Widsten, C.D. Cruz, G.C. Fletcher, M.A. Pajak, T.K. McGhie, Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 11146–11156.
- R.G. Panchal, S.P. Reid, J.P. Tran, A.A. Bergeron, J. Wells, K.P. Kota, J. Aman, S. Bavari, Identification of an antioxidant small molecule with broad-spectrum antiviral activity, *Antivir. Res.* 93 (2012) 23–29.
- C.C. Danta, P. Piplani, The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases, *Expert Opin. Drug Discov.* 9 (2014) 1205–1222.
- J. Tinkel, H. Hassaini, S.J. Khouri, Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms, *Cardiol. Rev.* 20 (2012) 77–83.
- F.M.F. Roleira, E.J. Tavares-Da-Silva, C.L. Varela, S.C. Costa, T. Silva, J. Garrido, F. Borges, Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties, *Food Chem.* 83 (2015) 235–2358.
- L.M. Sayre, G. Perry, M.A. Smith, Oxidative stress and neurotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 172–188.
- D. Schuppan, J.D. Jia, B. Brinkhaus, E.G. Hahn, Herbal products for liver diseases: a therapeutic challenge for the new millennium, *Hepatology* 30 (1999) 1099–1104.
- M. Reina, A. Martínez, Is silybin the best free radical scavenger compound in silymarin?, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 4568–4578.
- P.F. Surai, Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives, *Antioxidants* 4 (2015) 204–247.
- L. Mira, M. Silva, C.F. Manso, Scavenging of reactive oxygen species by silybin dihemisuccinate, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 753–759.
- R. Gazák, A. Svobodová, J. Pšotová, P. Sedmera, V. Prikrylová, D. Walterová, V. Křen, Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 5677–5687.
- A. Jain, N. Dwivedi, R. Bhargava, S.J.S. Flora, Silymarin and naringenin protects nicotine induced oxidative stress in young rats, *Oxid. Antioxid. Med. Sci.* 1 (2012) 41–49.
- C.C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 278–286.
- T.C. Bai, J.J. Zhu, J. Hu, H.L. Zhang, C.G. Huang, Solubility of silybin in aqueous hydrochloric acid solution, *Fluid Phase Equilib.* 254 (2007) 204–210.
- I. György, S. Antus, A. Blázovics, G. Földiák, Substituent effects in the free radical reactions of silybin: radiation-induced oxidation of the flavonoid at neutral pH, *Int. J. Rad. Biol.* 61 (1992) 603–609.
- E. van Wenum, R. Jurczakowski, G. Litwiniński, Media effects on the mechanism of antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin: role of the enol groups, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 9102–9112.
- K. Lemanska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, T. Zieliski, A.E.M. Soffers, I.M.C. Rietjens, The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxylflavones, *Free Radical Biol. Med.* 31 (2001) 869–881.
- P. Trouillas, P. Marsal, A. Svobodová, J. Vostálová, R. Gazák, J. Hrbáč, P. Sedmera, V. Křen, R. Lazzaroni, J.L. Duroux, D. Walterová, Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 1054–1063.
- M. Reina, A. Martínez, Silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans as free radical scavengers, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 11597–11606.
- S. Fan, M. Qi, Y. Yu, L. Li, G. Yao, S. Tashiro, S. Onodera, T. Ikejima, P53 activation plays a crucial role in silibinin induced ROS generation via PUMA and JNK, *Free Radic. Res.* 46 (2012) 310–319.
- A. Rajnochová, A. Svobodová, B. Zálešák, D. Biedermann, J. Ulrichová, J. Vostálová, Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 156 (2016) 61–68.
- R. Agarwal, C. Agarwal, H. Ichikawa, R.P. Singh, B.H. Aggarwal, Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side, *Ant. Res.* 26 (2006) 4457–4498.
- D. Gallo, S. Giacomelli, C. Ferlini, G. Raspaglio, P. Apollonio, S. Prislei, A. Riva, P. Morazzoni, E. Bombardelli, G. Scambia, Antitumour activity of the silybin-phosphatidylcholine complex idB 1016, against human ovarian cancer, *Eur. J. Cancer* 39 (2003) 2403–2410.
- M.C. Comelli, U. Mengs, C. Schneider, M. Prosdocimi, Toward the definition of the mechanism of action of silymarin: activities related to cellular protection from toxic damage induced by chemotherapy, *Integr. Cancer Ther.* 6 (2007) 120–129.
- G. Deep, R. Agarwal, Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer, *Integr. Cancer Ther.* 6 (2007) 130–145.
- S.K. Katiyar, Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects, *Int. J. Oncol.* 26 (2005) 169.
- M.G. Hertog, E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet* 342 (1993) 1007–1011.
- M.J. Wang, W.W. Lin, H.L. Chen, Y.H. Chang, H.C. Ou, J.S. Kuo, J.S. Hong, K.C.G. Jeng, Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation, *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 2103–2112.
- M. Gharagozloo, Z. Khoshdel, Z. Amirghofran, The effect of an iron (III) chelator, silybin, on the proliferation and cell cycle of Jurkat cells: a comparison with desferrioxamine, *Eur. J. Pharmacol.* 589 (2008) 1–7.
- M. Zatloukalová, V. Křen, R. Gazák, M. Kubala, P. Trouillas, J. Ulrichová, J. Vacek, Electrochemical investigation of flavonolignans and study of their interactions with DNA in the presence of Cu(II), *Bioelectrochemistry* 82 (2011) 117–1124.
- L. Mira, M.T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M.H. Florencio, K.R. Jennings, Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity, *Free Rad. Res.* 36 (2002) 1199–1208.
- H. Wagner, L. Hörhammer, R. Münster, On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.), *Arzneimittelforschung* 18 (1968) 688–696.
- G.W. Burton, K.U. Ingold, Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science* 224 (1984) 569–573.

- [43] A. Galano, G. Mazzone, R. Álvarez-Diduk, T. Marino, J.R. Álvarez-Idaboy, N. Russo, Food antioxidants: chemical insights at the molecular level, *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 7 (2016) 335–352.
- [44] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chem.* 125 (2011) 288–306.
- [45] G. Mazzone, N. Malaj, A. Galano, N. Russo, M. Toscano, Antioxidant properties of several coumarin-chalcone hybrids from theoretical insights, *RSC Adv.* 5 (2015) 565–575.
- [46] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, 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, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople Gaussian 09, Revision A.08 Inc., Wallingford, CT, 2009.
- [47] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2008) 215.
- [48] G.A. Petersson, A. Bennett, T.G. Tensfeldt, M.A. Al-Laham, W.A. Shirley, J.A. Mantzaris, A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row atoms, *J. Chem. Phys.* 89 (1988) 2193–2198.
- [49] G.A. Petersson, M.A. Al-Laham, A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms, *J. Chem. Phys.* 94 (1991) 6081–6090.
- [50] A.D. McLean, G.S. Chandler, Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11–18, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 5639–5648.
- [51] K. Raghavachari, J.S. Binkley, R. Seeger, J.A. Pople, Self-consistent molecular orbital methods. 20. Basis set for correlated wave-functions, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 650–654.
- [52] P.J. Hay, W.R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations – potentials for the transition-metal atoms Sc to Hg, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 270–283.
- [53] W.R. Wadt, P.J. Hay, Ab initio effective core potentials for molecular calculations – potentials for main group elements Na to Bi, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 284–298.
- [54] P.J. Hay, W.R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations – potentials for K to Au including the outermost core orbitals, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 299–310.
- [55] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6378.
- [56] A. Martínez, M.A. Rodríguez-Gironés, A. Barbosa, M. Costas, Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins, *J. Phys. Chem. A* 112 (2008) 9037–9042.
- [57] A. Martínez, R. Vargas, A. Galano, What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on electron transfer reactions between carotenoids and free radicals, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 12113–12120.



Copper or free radical scavenger?



Ana Martínez*, Miguel Reina

Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S.N., Ciudad Universitaria, P.O. Box 70-360, Coyoacán C.P. 04510, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2017
Received in revised form 19 January 2017
Accepted 30 January 2017
Available online 1 February 2017

Keywords:

Free radicals scavengers
Copper chelation
Copper scavengers
Hydrogen atom transfer
Radical adduct formation

ABSTRACT

Free radicals are very reactive molecules that produce so-called oxidative stress. To prevent oxidative stress there are two types of molecules: primary and secondary antioxidants. The chelation of copper is an example of a secondary antioxidant process. Therefore, these secondary antioxidants can be named *copper scavengers*. The main purpose of this investigation is to compare the capacity of four molecules: silybin (SIL); astaxanthin (ASTA); the hormone melatonin (MELA) and one of the metabolites of MELA named cyclic 3-hydroxymelatonin (3OHM) to scavenge copper, instead of a free radical. In order to decide whether these molecules are predominantly free radical scavengers rather than *copper scavengers*, we studied their primary antioxidant capacity analyzing their interaction with $\cdot\text{OH}$ and two mechanisms: Radical Adduct Formation (RAF) and Hydrogen Atom Transfer (HAT). In order to study *copper scavenger* capacity, we investigated the formation of chelate complexes with Cu(II) by these four molecules and their interaction with Cu(I). In the presence of Cu ions and free radicals, SIL, ASTA, MELA and 3OHM preferentially react with $\cdot\text{OH}$. These molecules are able to act as *copper scavengers* but not in the presence of $\cdot\text{OH}$ and therefore play a limited role as chelating agents.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

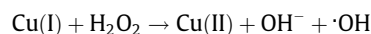
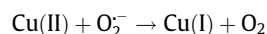
Reactive oxygen species (ROS) are very well-known molecules that are formed during metabolism and play important roles in cell signaling [1]. These species are very reactive free radicals that can bond to biomolecules and cause a wide variety of diseases [2–13]. ROS levels in the human body can increase dramatically due to stress, UV radiation, the presence of metal ions or many others factors, such as heat exposure [14–16]. Excess of ROS produces so-called oxidative stress; a harmful phenomenon caused by an imbalance between the production and consumption of free radicals, which correlates with numerous illnesses [10–24].

Molecules that scavenge free radicals prevent oxidative stress. These molecules are also known as antioxidants. They have been studied extensively, because they show several positive effects on human health [17–24]. Two processes are involved in scavenging free radicals to prevent oxidative stress [25]: direct reaction with ROS (primary free radical scavengers) or reaction with species that generate free radicals preventing the production of ROS (secondary antioxidants). Chelation of metal atoms (such as copper) is one of the processes undergone by secondary antioxidants and the

importance of this mechanism for human health has been demonstrated [26–33].

Copper is one of the most important trace metals in the human body. On average, the adult liver contains from 18 to 45 μg Cu/g dry weight, while blood contains about 6 mg of Cu [34,35]. As is the case with almost all substances, it can be either beneficial or toxic depending on its concentration [36]. Copper is commonly found as Cu(II) or Cu(I) and the ionic form can be interconverted by redox reactions.

Copper produces hydroxyl radicals in the Haber-Weiss reaction, as shown in the following [37,38]:



A small amount of copper is capable of producing a large amount of $\cdot\text{OH}$ free radicals as Cu(II) and Cu(I) act as catalysts in the reaction. Secondary antioxidants react with copper forming chelates, thus preventing the formation of free radicals. In this sense, these molecules can be labeled as *copper scavengers*. In fact, the same molecule can act either as an antioxidant and/or a *copper scavenger*. Many studies analyze one or other of these roles and reach conclusions concerning primary or secondary antioxidant capacity [27,28,39–42]. Copper and free radicals are both present in the human body and may compete to react with the scavenger.

* Corresponding author.

E-mail address: martina@unam.mx (A. Martínez).

A single scavenger may trap free radicals or copper ions, depending on thermodynamics and kinetics. It is thus very important to compare these two mechanisms, although few investigations attempt this [28,39,43].

The main purpose of this investigation is to compare the capacity for scavenging copper with that of scavenging free radicals, on the part of four molecules: silybin (SIL); astaxanthin (ASTA); the hormone melatonin (MELA) and one of the metabolites of MELA named cyclic 3-hydroxymelatonin (3OHM), also reported as a good scavenger [43]. Schematic representation of these molecules is included in Fig. 1. The idea is to compare four different substances: SIL is a dietary supplement; ASTA is present in human food; MELA and 3OHM are human hormones.

SIL is the most abundant component of silymarin, the active substance of milk thistle plant (*Silybum marianum*) [44,45]. Protective action on the part of SIL is thought to be derived from its antioxidant properties and theoretical and experimental evidence suggests that SIL is a primary antioxidant by different mechanisms, such as the sequential electron transfer (SET) or the single proton loss electron transfer (SPLET) [44–66]. Likewise experimental reports point to the secondary antioxidant capacity of SIL by chelating Cu(II) but theoretical investigations are scarce [41]. ASTA is found in food (fruits, vegetables and salmon for example) and it forms M-O bonds with metal ions, including Cu(II) [27]. It is a carotenoid that was previously reported as a good free radical scavenger molecule [27,39,67–69]. MELA in humans is produced by the pineal gland. It helps to regulate sleep and wake cycles. 3OHM is one of its metabolites. Both molecules were reported as good copper scavengers and also as good free radical scavengers [28,43,70].

In order to decide whether these molecules have greater tendency to act as free radical scavengers rather than copper scavengers, we studied their primary free radical scavenger capacity, analyzing the interaction with $\cdot\text{OH}$ and employing two mechanisms: the Radical Adduct Formation (RAF) and the Hydrogen Atom Transfer (HAT). $\cdot\text{OH}$ was selected because it is one of the

most reactive free radicals and because it is produced by Cu(II) in the Haber-Weiss reaction. Copper scavenger capacity was assessed by investigating the formation of chelate complexes by these four molecules (SIL, ASTA, MELA and 3OHM) with Cu(II) and also the interaction with Cu(I). Some of these results have been reported previously [27,28,43], however for consistency and for comparative purposes, we recalculated the most stable structures. Our most important conclusion indicates that in the presence of Cu ions and free radicals, SIL, ASTA, MELA and 3OHM preferentially react with $\cdot\text{OH}$. Consequently it was impossible for these molecules to act as copper scavengers in the presence of $\cdot\text{OH}$, thus limiting their role as chelating agents. A single scavenger may trap free radicals or copper ions, depending on thermodynamics. In this sense, it is imperative in future works to compare these two mechanisms because free radicals and copper ions are both present.

2. Computational details

Gaussian 09 code [71] was implemented to optimize all structures. Initial geometries were fully optimized at M06/6-31+G(d,p) level of theory [72–76] in conjunction with SMD continuum model using water to mimic a polar environment [77]. This methodology has been successfully used to study small organic molecules interacting with metal atoms [28,30]. Harmonic analyses were calculated to verify local minima (zero imaginary frequencies). In Fig. 1 we present a schematic representation of SIL with the conventional numbering of $-\text{OH}$ and $-\text{OCH}_3$ groups and labeling the aromatic and heterocyclic rings for future reference. To investigate the chelation of Cu with the four molecules under study, two possible mechanisms reported before [28] are analyzed: the direct chelation and the coupled deprotonation-chelation. In the first one, SIL, ASTA, MELA and 3OHM form chelates with Cu(II) and bonded with Cu(I). In the second one, all the molecules are first deprotonated and then chelate to Cu(II) or bonded with Cu(I). For the direct chelation mechanism, the Gibbs free energies (ΔG) are calculated as follows:

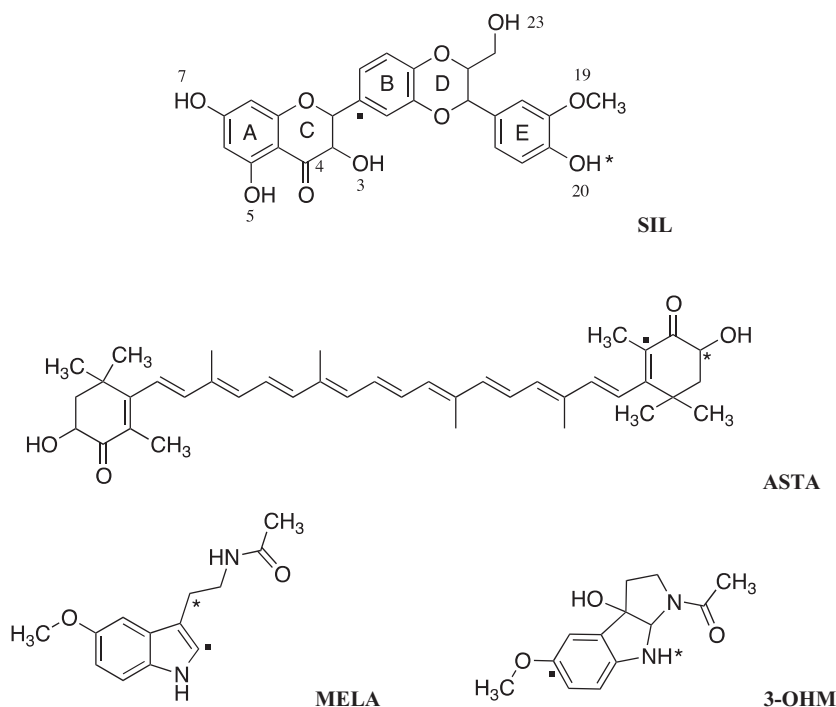
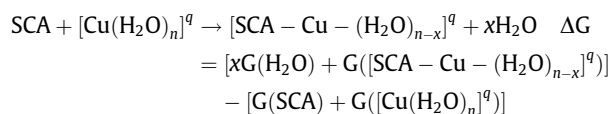
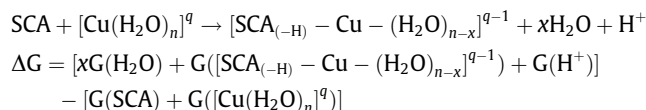


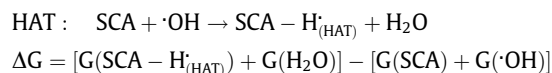
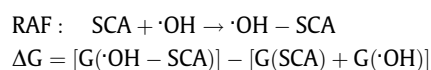
Fig. 1. Schematic representation of silybin (SIL), astaxanthin (ASTA), melatonin (MELA) and cyclic 3-hydroxymelatonin (3OHM). Bullet (■) indicates the preferred reaction site for RAF mechanism. Star (*) indicates the hydrogen atom that was transferred in the case of the HAT mechanism.



SCA is the scavenger, i.e. SIL, ASTA, MELA or 3OHM; $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_n]^q$ represents copper ions coordinated to water molecules. For Cu(II), we modeled the complex with $n = 4$ (four water molecules since four-coordinate configuration is favored for Cu(II)) and for Cu(I) we employed $n = 2$ (two water molecules since two-coordinate configuration is favored for Cu(I)); q represents the charge of the system and it is +2 and +1, for Cu(II) and Cu(I), respectively. For coupled deprotonation-chelation mechanism, the Gibbs free energies (ΔG) are obtained with the next reaction scheme:



SCA is the scavenger, i.e. SIL, ASTA, MELA or 3OHM; $\text{SCA}_{(-\text{H})}$ is de-protonated SCA. In this equation q is equal to +1 or 0, for Cu(II) and Cu(I) respectively. As suggest by Camaioni et al. [78], the proton Gibbs free energy in aqueous solution used in this work is $G(\text{H}^+) = -270.28$ kcal/mol. In order to investigate RAF and HAT mechanisms, the following equations were used:



SCA is the scavenger, i.e. SIL, ASTA, MELA or 3OHM; $\text{SCA}-\text{H}_{(\text{HAT})}$ is de-hydrogenated SCA.

3. Results and discussion

3.1. Geometry optimization

Initial geometries used for SIL-Cu(II) are those that can form chelates. Cu(II) is tetra-coordinate and for this reason SIL-Cu(II) complex has two water molecules. In SIL there are three possible positions for the chelation process: O4-O3, O4-O5 and O19-O20 (see Fig. 1). Fig. 2 presents the optimized structures of SIL-Cu(II) and the relative energy with respect to the most stable. In this case, we are analyzing direct chelation mechanism. Evidently, the most stable structure presents Cu(II) bonded to O3 and O4. The least stable structure is 6.6 kcal/mol higher in energy, and shows Cu(II) bonded to O19-O20. This latter structure has one hydrogen

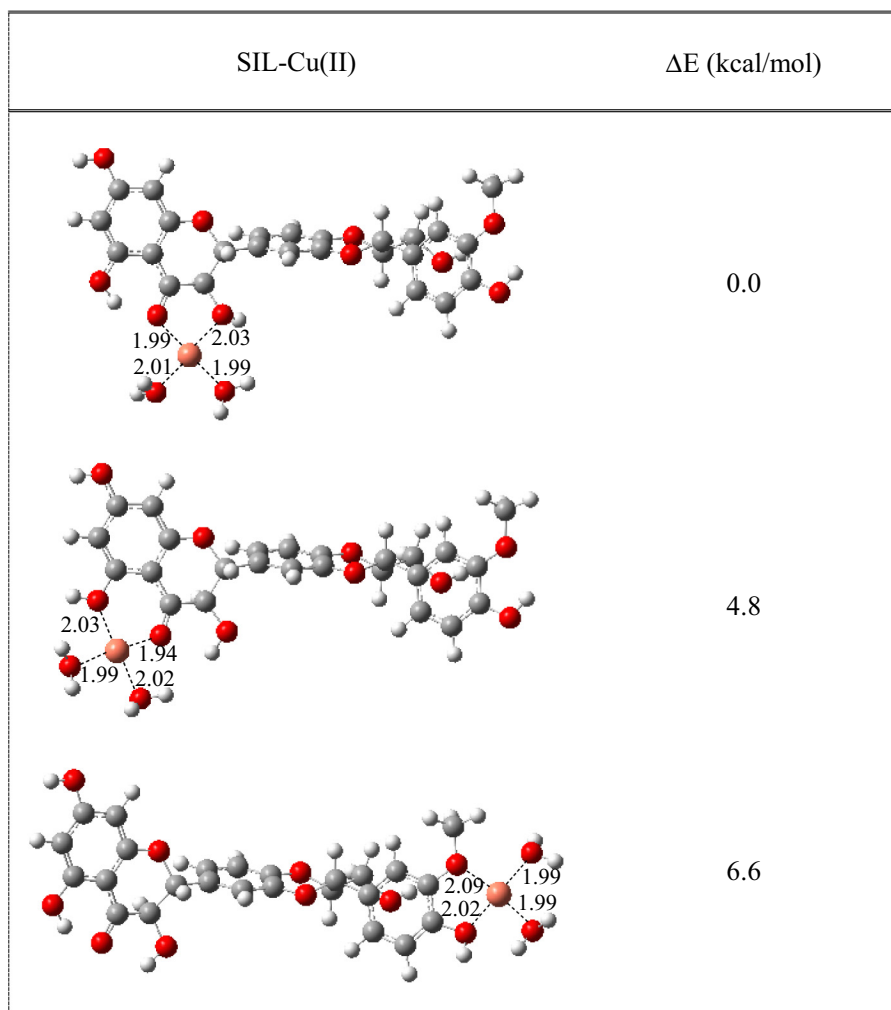


Fig. 2. Optimized structures of SIL interacting with Cu(II). The global charge of the molecules is +2. There are two water molecules bonded to the copper atom. Relative energies with respect to the most stable structure are included.

bond less than the other two in Fig. 2, a factor that contributes to destabilization. As reported previously, this may be due to the importance of the different intramolecular hydrogen bonds present in the molecule [56,57]. Because the energy difference is not very large, we expect these to form under experimental conditions. Fig. 3 presents the most stable structures for $\text{SIL}_{(-\text{H})}\text{-Cu(II)}$ resulting from the coupled-deprotonation-chelation mechanism. The stability of the structures is similar to previous results shown in Fig. 2. The most stable structure is where Cu(II) forms a chelate with O4–O5. This structure has been experimentally reported as the most stable example of a silybin derivative [42]. The structure interacting with O3–O4 is the least stable. The preferred chelation site is pH dependent because deprotonated SIL is present at high pH values and therefore, the chelation site changes from O3–O4 to O4–O5. This is related to the stabilization of the different intramolecular hydrogen bonds in SIL. Distances between the metal atom and SIL are slightly shorter employing the coupled deprotonation-chelation mechanism, than they are employing the direct mechanism.

The optimized structures presented in Fig. 4 represent the direct chelation mechanism with Cu(I). We obtained four stable geometries for structures corresponding to SIL-Cu(I) . In all cases, Cu(I) was simulated in a linear two-coordination geometry. The ground state presents a water molecule formed from one hydrogen bond with one oxygen atom of SIL, with Cu forming a bridge

between two oxygen atoms. All the structures present similar stability and may be present under experimental conditions. In Fig. 5, the optimized structures for the coupled deprotonation-chelation process with Cu(I) are shown. The coupled deprotonation-chelation mechanism suggests that one proton is dissociated and one Cu atom is bonded at the same position where this dissociation takes place. The most stable geometry presents Cu(I) bonded to O7. The hydrogen at position O7 is the most acid and therefore the dissociation of this proton is more favorable than the dissociation of other protons. The structures in Fig. 5 show minimal variation in terms of stability and therefore it is no surprise to find all these in an experiment. Notably, in the case of Cu(II), we did not report the structure derived from the deprotonation of a proton bonded to O7, although this is the most acid, as it results in a less stable structure for Cu(II). It shows a greater tendency to form bidentate compounds than to bond with a single oxygen atom that is de-protonated.

The optimized structures of ASTA interacting with Cu ions are reported in Fig. 6. The structures for ASTA-Cu(II) forming a chelate with two oxygen atoms have been reported previously [27]. For consistency, we recalculated these geometries, applying methodology from this investigation. Cu(II) is tetra-coordinate because it has two water molecules. For Cu(I), we consider a linear two-coordination geometry. For the coupled deprotonation-chelation process, one of the OH groups is deprotonated and Cu(II) or Cu(I)

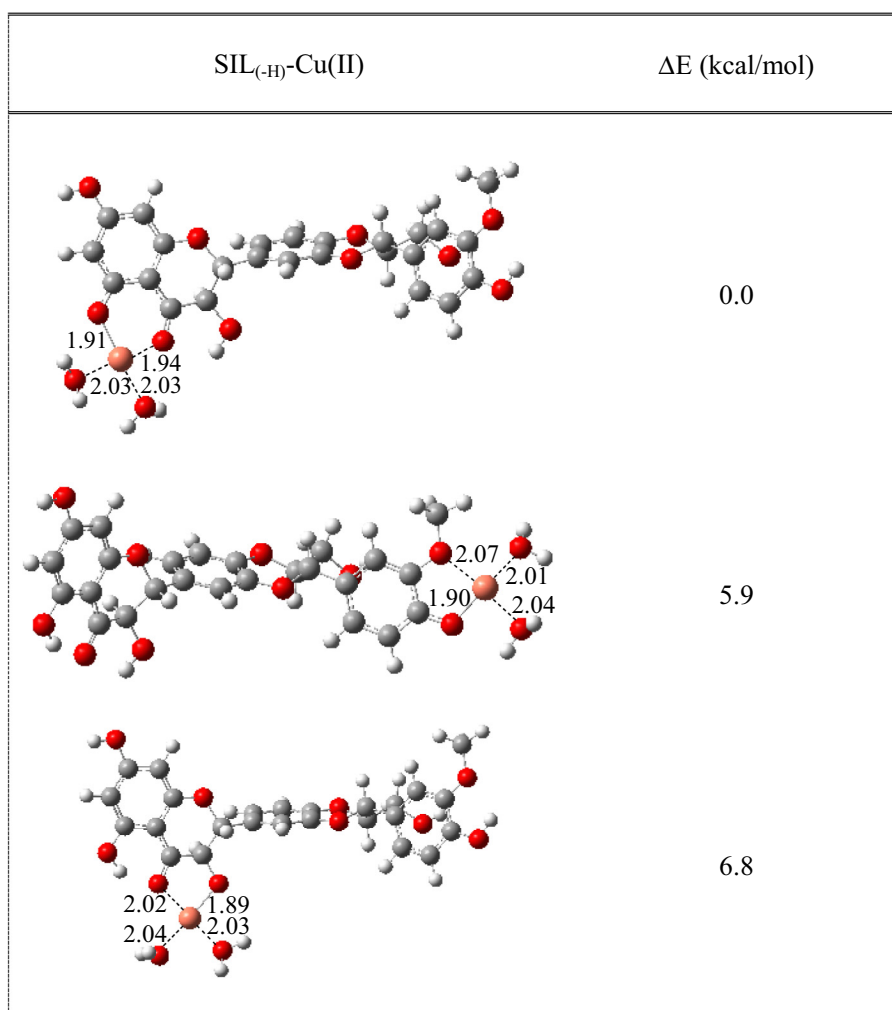


Fig. 3. Optimized structures of deprotonated SIL ($\text{SIL}_{(-\text{H})}$) interacting with Cu(II). The global charge of the molecules is +1. There are two water molecules bonded to the copper atom. Relative energies with respect to the most stable structure are included.

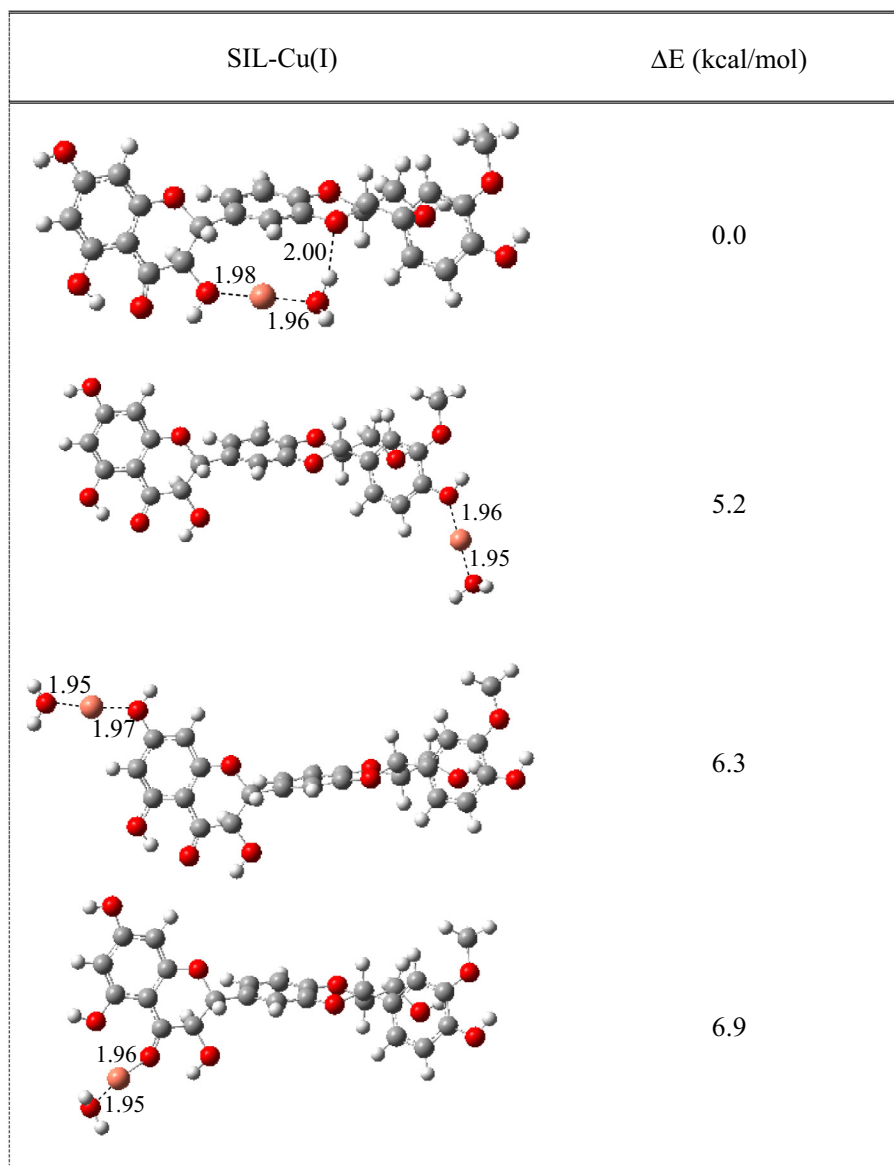


Fig. 4. Optimized structures of SIL interacting with Cu(I). The global charge of the molecules is +1. There is one water molecule bonded to the copper atom. Relative energies with respect to the most stable structure are included.

is bonded to that position. ASTA may simultaneously chelate two Cu atoms, as it has two oxygen atoms; one at each extreme of the molecule. However, in this investigation we will consider only one metal atom in order to facilitate direct comparison with the other molecules.

Figs. 7 and 8 present the optimized structures of MELA and 3OHM, respectively. Molecules are interacting with Cu(II) and Cu(I). These structures were obtained previously, using another methodology [28] and were deemed to be the most stable. For consistency, we have recalculated these geometries applying methodology from this investigation. Our results are similar to those reported previously.

Optimized structures of the RAF and HAT mechanisms are included as [Supplementary Material](#).

3.2. Copper scavengers

Table 1 presents the Gibbs free energies (ΔG) associated with the direct chelation process involving Cu(II) and Cu(I). Only the

most stable structures are considered. Some previously reported values are also included. Evidently, results are similar to those obtained before, using other methodology. With Cu(II) all values are negative and therefore the reaction is exergonic. The reaction of ASTA and 3OHM with Cu(II) is more exergonic than the corresponding reaction with SIL and MELA. Therefore, ASTA and 3OHM are the best Cu(II) scavengers. In the case of Cu(I), the reaction with SIL has a very small negative value of ΔG and with ASTA it is small and positive. MELA and 3OHM present negative ΔG values with Cu(I). According to these results, SIL and ASTA are good Cu(II) scavengers but are not good secondary antioxidants, if the reaction with Cu(I) is considered. This is an important finding because Cu(II) is the most abundant copper ion in the human body. MELA and 3OHM are good *copper scavengers* for both, Cu(II) and Cu(I) but the reactions are not very exergonic. Apparently, MELA and 3OHM are better able to sequester Cu(I) than SIL and ASTA.

The Gibbs free energies for the coupled deprotonation–chelation process are reported in Table 2. This mechanism depends indirectly on the dissociation energy of H⁺. Some previously reported values

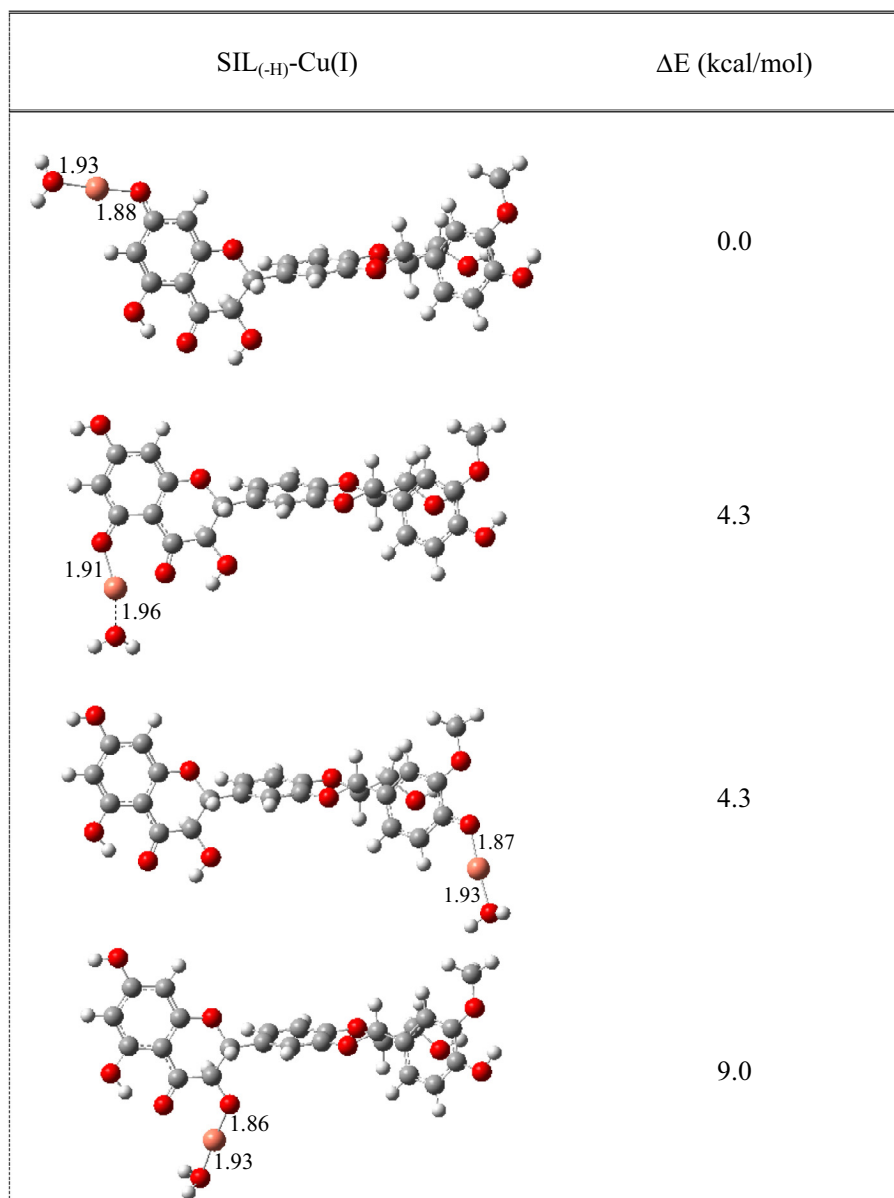


Fig. 5. Optimized structures of de-protonated SIL (SIL_(-H)) interacting with Cu(I). The global charge of the molecules is 0. There is one water molecule bonded to the copper atom. Relative energies with respect to the most stable structure are included.

are also included. It is apparent that results are similar to those obtained before, using other methodology. Firstly, it is notable that all reactions with Cu(I) are endergonic and therefore not thermodynamically feasible. However, reactions with Cu(II) are all exergonic with the exception of MELA_(-H). Values reported in Table 2 indicate that 3OHM_(-H) and SIL_(-H) are better Cu(II) scavengers than ASTA_(-H) with respect to the coupled-deprotonated-chelation mechanism, and MELA_(-H) will not scavenge Cu(II) because this reaction is endergonic.

If we compare values from Table 1 with those from Table 2, it is apparent that the coupled deprotonated-chelation mechanism is the main reaction pathway involved in the copper sequestering action of SIL, but it is not the case for 3OHM, ASTA and MELA. For ASTA, the direct chelation mechanism is more exergonic than the coupled deprotonated-chelation mechanism. For 3OHM, both mechanisms have almost the same Gibbs free energy values, and for MELA the direct chelation mechanism is exergonic, whereas the coupled deprotonated-chelating mechanism is not.

In summary and considering both chelating mechanisms (direct and coupled deprotonation), SIL, ASTA and 3OHM are better scavengers for Cu(II) than MELA. Concerning Cu(I), reactions with SIL and ASTA are not favorable, and although possible with MELA and 3OHM, this only occurs by means of the direct chelation mechanism.

3.3. Free radical scavengers. RAF and HAT mechanisms

Tables 3 and 4 report the ΔG values for the RAF and the HAT processes, respectively. Some previously reported results are also included in brackets. Our results are similar in the sense that the reactions are exergonic or endergonic, irrespective of method. Results of ASTA show the biggest difference. In this molecule, the difference in optimized geometries is also the largest. As expected, all reactions with ·OH are exergonic. The Gibbs free energies for both mechanisms indicate that the reactions of MELA and 3OHM

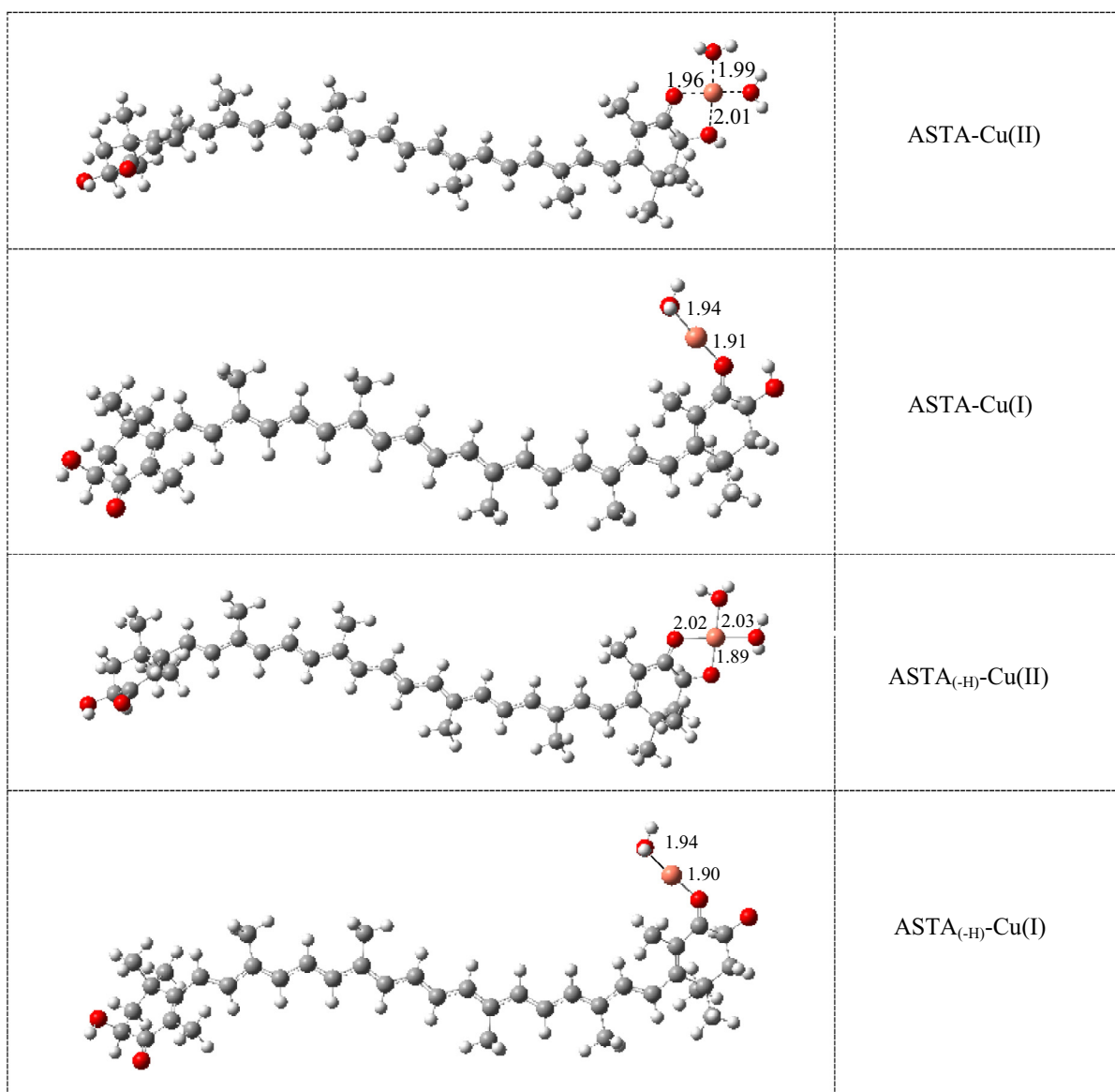


Fig. 6. Optimized structures of ASTA and de-protonated ASTA (ASTA_(-H)) interacting with Cu(II) and Cu(I).

are more exergonic than the reactions with SIL and ASTA. The preferred mechanism for all systems is HAT.

3.4. Copper or free radical scavengers?

This investigation's main objective is to decide whether chelating molecules effectively diminish oxidative stress by sequestering copper in the presence of free radicals. Molecules may either chelate copper ions or scavenge free radicals. To assess which mechanism prevails according to thermodynamics, we compare the results in Tables 1–4. In each case, we selected the most exergonic reactions, assuming that the scavenger will be in contact with both, copper and ·OH free radical.

For SIL as *copper scavenger*, the main mechanism is the coupled deprotonation-chelation (ΔG value is -13.61 kcal/mol). The preferred *free radical scavenger* mechanism is HAT with ·OH. The latter is more exergonic (ΔG value is -22.14 kcal/mol) than the former. Therefore, in the presence of both (Cu(II) and ·OH), SIL will preferably act as a *free radical scavenger*. Similar results are found for ASTA. To sequester Cu(II), the reaction of the direct chelation mechanism is exergonic (ΔG value is -10.35 kcal/mol), but the

reaction to scavenge ·OH is more exergonic (ΔG equal to -27.77 kcal/mol). For MELA and 3OHM the comparison is even clearer. MELA as *copper scavenger* reacts with Cu(II) through the direct chelation mechanism but ΔG value is nine times smaller than the ΔG value of the HAT reaction with ·OH (-4.04 versus -36.22 kcal/mol). Finally, the same conclusion is reached with 3OHM. The ΔG value for the chelating mechanism is almost four times smaller than the ΔG value of the HAT reaction with ·OH (-12.52 versus -45.26 kcal/mol). Moreover, one of the most reactive free radicals is OH·. It can be expected that studied compounds will react faster with this free radical than with copper cation. Therefore, it will be difficult to scavenge copper in the presence of OH· [81]. In summary, none of the studied molecules will be a good *copper scavenger* in the presence of ·OH. Scavengers can work on Cu before ·OH is formed.

4. Concluding remarks

The reactions of SIL and ASTA with Cu(II) are exergonic but they are endergonic if the reaction with Cu(I) is considered. MELA and 3OHM are good *copper scavengers* for both, Cu(II) and Cu(I) but

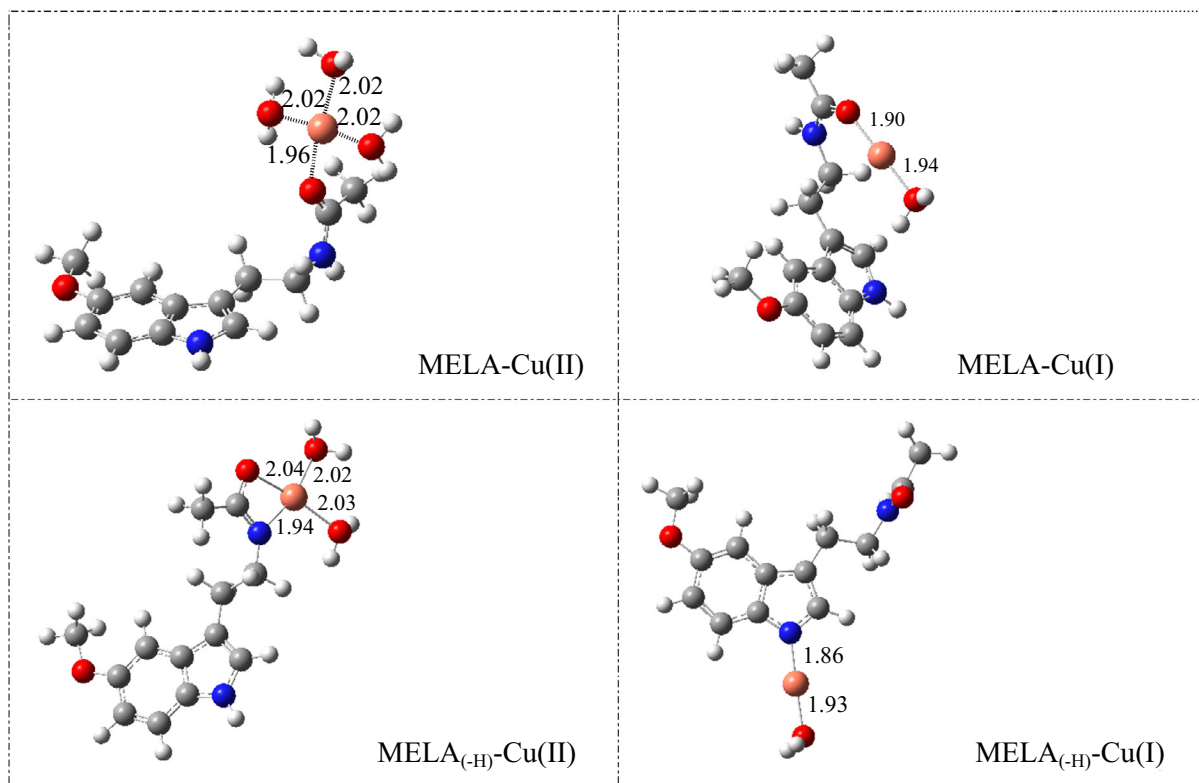


Fig. 7. Optimized structures of MELA and de-protonated MELA (MELA_(-H)) interacting with Cu(II) and Cu(I).

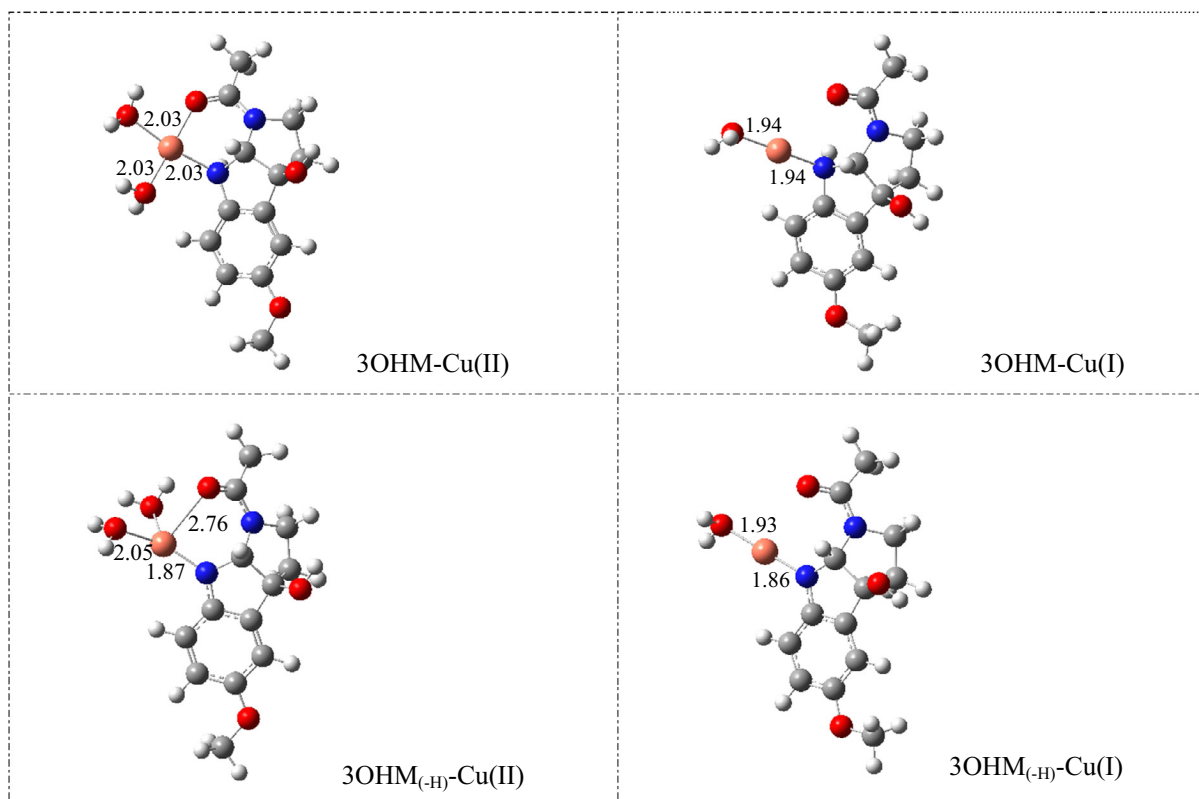


Fig. 8. Optimized structures of 3OHM and de-protonated 3OHM (3OH_(-H)) interacting with Cu(II) and Cu(I).

Table 1

Values are ΔG (Gibbs free energies of reaction) for the direct chelation mechanism (in kcal/mol at 298.15 K). Values in brackets form Ref. [28].

SIL-Cu(II)	SIL-Cu(I)
−8.15	−0.59
ASTA-Cu(II)	ASTA-Cu(I)
−10.35	0.51
MELA-Cu(II)	MELA-Cu(I)
−4.04 (−2.49)	−2.31 (−3.64)
3OHM-Cu(II)	3OHM-Cu(I)
−12.52 (−7.06)	−6.41 (−5.18)

Table 2

Values are ΔG (Gibbs free energies of reaction) for the coupled deprotonation-chelation process (in kcal/mol at 298.15 K). Values in brackets form Ref. [28].

SIL _(-H) -Cu(II)	SIL _(-H) -Cu(I)
−13.61	3.71
ASTA _(-H) -Cu(II)	ASTA _(-H) -Cu(I)
−8.06	29.56
MELA _(-H) -Cu(II)	MELA _(-H) -Cu(I)
2.76 (8.22)	10.31 (11.28)
3OHM _(-H) -Cu(II)	3OHM _(-H) -Cu(I)
−12.03 (−13.39)	12.24 (12.59)

Table 3

Values are ΔG (Gibbs free energies of reaction) for the RAF process (in kcal/mol at 298.15 K). Values in brackets form Refs. [43,79,80].

	SIL	ASTA	MELA	3OHM
.OH	−10.56	−15.16 (−32.43)	−23.97 (−25.7)	−20.73 (−19.11)

Table 4

Values are ΔG (Gibbs free energies of reaction) for the HAT process (in kcal/mol at 298.15 K). Values in brackets form Refs. [43,80].

	SIL	ASTA	MELA	3OHM
.OH	−22.14	−27.77	−36.22 (−31.40)	−45.26 (−35.76)

the reactions are not very exergonic. Apparently, MELA and 3OHM are better able to react with Cu(I) than SIL and ASTA.

As expected, all reactions with ·OH are exergonic. The Gibbs free energies for RAF and HAT mechanisms indicate that the reactions of MELA and 3OHM are more exergonic than the reactions with SIL and ASTA. The preferred mechanism for all systems is HAT.

SIL, ASTA, MELA and 3OHM can be either *copper scavengers* or *free radical scavengers* according to thermodynamics. In the human body, both copper and free radicals compete to react with the scavenger. Thermodynamics will determine whether a particular antioxidant will trap free radicals or copper ions. In this sense, the comparison of these two mechanisms is desirable because free radicals and copper ions are both present. For the molecules in this investigation and based on Gibbs free energies, it is possible to conclude that SIL, ASTA, MELA and 3OHM are better *scavengers of free radical* than they are of copper.

Acknowledgements

This study was funded by DGAPA-PAPIIT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and resources provided by the Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM). This work was carried out using a NES supercomputer, provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We would like to thank the DGTIC of UNAM for their excellent and free

supercomputing services and Caroline Karlslake (Masters, Social Anthropology, Cambridge University, England) for reviewing the grammar and style of the text in English. The authors would like to acknowledge Oralia L Jiménez A., María Teresa Vázquez, Alberto López Vivas and Caín González for their technical support. MR thanks CONACyT for the PhD scholarship (387687).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2017.01.033>.

References

- [1] M.E. Sosa-Torres, J.P. Saucedo-Vázquez, P.M. Kroneck, The dark side of dioxygen, in: P.M. Kroneck, M.E. Torres (Eds.), *Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases, Metal Ions in Life Sciences*, vol. 15, Springer, 2015, pp. 1–12, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-12415-5_1.
- [2] S.K. Yang, L. Xiao, J. Li, F. Liu, L. Sun, Oxidative stress, a common molecular pathway for kidney disease: role of the redox enzyme p66Shc, *Ren. Fail.* 36 (2014) 313–320.
- [3] G. Aruna, K. Ambika Devi, Oxidative stress in chronic renal failure, *Int. J. Pharma Bio Sci.* 5 (2014) B127–B133.
- [4] M. Shadab, D.K. Agrawal, M. Aslam, N. Islam, Z. Ahmad, Occupational health hazards among sewage workers: oxidative stress and deranged lung functions, *J. Clin. Diagn. Res.* 8 (2014) BC11–BC13.
- [5] N. Ghasemzadeh, R.S. Patel, D.J. Eapen, E. Veledar, H.A. Kassem, P. Manocha, M. Khayata, A.M. Zafari, L. Sperling, D.P. Jones, A.A. Quyyumi, Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans, *Hypertension* 63 (2014) 1270–1275.
- [6] M. Veselinovic, N. Barudzic, M. Vuletic, V. Zivkovic, A. Tomic-Lucic, D. Djuric, V. Jakovljevic, Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to disease activity, *Mol. Cell. Biochem.* 391 (2014) 225–232.
- [7] S. Kundu, P. Ghosh, S. Datta, A. Ghosh, S. Chattopadhyay, M. Chatterjee, Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis, *Free Radical Res.* 46 (2012) 1482–1489.
- [8] J. Wang, J.Z. Li, A.X. Lu, K.F. Zhang, B.J. Li, Anticancer effect of salidroside on A549 lung cancer cells through inhibition of oxidative stress and Phospho-p38 expression, *Oncol. Lett.* 7 (2014) 1159–1164.
- [9] S. Granados-Principal, N. El-Azem, R. Pamplona, C. Ramirez-Tortosa, M. Pulido-Moran, L. Vera-Ramirez, J.L. Quiles, P. Sanchez-Rovira, A. Naudí, M. Portero-Otin, P. Perez-Lopez, M. Ramirez-Tortosa, Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer, *Biochem. Pharmacol.* 90 (2014) 25–33.
- [10] M. Pohanka, Alzheimer's disease and oxidative stress: a review, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 356–364.
- [11] M.H. Yan, X. Wang, X. Zhu, Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease, *Free Radical Biol. Med.* 62 (2013) 90–101.
- [12] B. Halliwell, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment, *Drugs Aging* 18 (2001) 685–716.
- [13] L.M. Sayre, G. Perry, M.A. Smith, Oxidative stress and neurotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 172–188.
- [14] K. Michail, A. Baghdasarian, M. Narwale, N. Aljuhani, A.G. Siraki, Scavenging of free-radical metabolites of aniline xenobiotics and drugs by amino acid derivatives: toxicological implications of radical-transfer reactions, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 1872–1883.
- [15] E. Vejerano, S. Lomnicki, B. Dellinger, Lifetime of combustion-generated environmentally persistent free radicals on Zn(II)O and other transition metal oxides, *J. Environ. Monit.* 14 (2012) 2803–2806.
- [16] N. Valencia-Islas, A. Zambrano, J.L. Rojas, Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City, *J. Chem. Ecol.* 33 (2007) 1619–1634.
- [17] H. Parhiz, A. Roohbakhsh, F. Soltani, R. Rezaee, M. Iranshahi, Antioxidant and anti-inflammatory properties of citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an update review of their molecular mechanism and experimental models, *Phytother. Res.* 29 (2015) 323–331.
- [18] P. Widsten, C.D. Cruz, G.C. Fletcher, M.A. Pajak, T.K. McGhie, Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 11146–11156.
- [19] R.G. Panchal, S.P. Reid, J.P. Tran, A.A. Bergeron, J. Wells, K.P. Kota, J. Aman, S. Bavari, Identification of an antioxidant small molecule with broad-spectrum antiviral activity, *Antivir. Res.* 93 (2012) 23–29.
- [20] C.C. Danta, P. Piplani, The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases, *Expert Opin. Drug Discov.* 9 (2014) 1205–1222.

- [76] K. Raghavachari, J.S. Binkley, R. Seeger, J.A. Pople, Self-consistent molecular orbital methods. 20. Basis set for correlated wave-functions, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 650–654.
- [77] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6378.
- [78] D.M. Camaioni, C.A. Schwerdtfeger, Comment on accurate experimental values for the free energies of hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 10795–10797.
- [79] A. Galano, On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 7178–7188.
- [80] A. Martínez, A. Galano, R. Vargas, Theoretical study on the chemical fate of adducts formed through free radical addition reactions to carotenoids, *Theor. Chem. Acc.* 127 (2010) 595–603.
- [81] L.M. Dorfman, G.E. Adams, Reactivity of the Hydroxyl Radical in Aqueous Solutions, National Bureau of Standards, Washington D. C., 1973, pp. 32–37, NSRDS-NBS 46.