

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
DERIVADOS DE HIDROXICUMARINA EN SISTEMAS
HOMOGÉNEOS Y EN MODELOS DE MEMBRANA
LIPÍDICA”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctora en Química**

Por:

FERNANDA ROXANA PÉREZ CRUZ

**Director de Tesis
Dr. Claudio Olea Azar**

**CoDirector de Tesis
Dr. Camilo López Alarcón**

**Santiago, Chile
2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

FERNANDA ROXANA PÉREZ CRUZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2014.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar

CoDirector de Tesis:

Dr. Camilo López Alarcón

Comisión Informante:

Dr. Hernán Pessoa Mahana (Presidente)

Dr. Hernán Speisky Cosoy

Dr. Marcelo Kogan Bosian

Dr. Alexis Aspee Lamas

"Lo personal es político"

Kate Millet

"Lo que puede el sentimiento no lo ha podido el saber. Ni el más claro proceder ni el más ancho pensamiento"

Violeta Parra

"Nunca darse por vencido
Nunca aparentar
Nunca mantenerse inmóvil
Nunca aferrarse al pasado
Nunca dejar de soñar"

Steve jobs

Dedico esta tesis a mi papá que con su infinito amor me llenó de fuerza y valentía para terminar este, uno de mis sueños.

Agradecimientos

Extiendo estos agradecimientos al Doctor Claudio Olea y al Doctor Camilo López por haber aceptado ser mis profesores guías, director y codirector de tesis. Esto último sólo lo escribo por protocolo, ya que para mí, Camilo ha sido un excelente director de tesis. A la comisión examinadora de mi tesis, al Doctor Hernán Pessoa quien fue el Presidente de mi comisión y al Doctor Hernán Speisky quienes fueron de gran apoyo en el desarrollo de esta investigación. Además, quiero agradecer al Doctor Marcelo Kogan y el Doctor Alexis Aspee por su sentido crítico de formación teórica y principalmente al Doctor Aspee por haber sido parte de esta comisión en reemplazo de la Doctora Elsa Abuin (RIP) con quién compartí mi proyecto en pañales cuyo aporte fue muy importante. A la secretaría de posgrado por su intenso trabajo y apoyo en la gestión de todo lo que requerí durante estos cinco años a la Sra. Myriam, Sra. María y a Héctor.

Además quiero agradecer muy sentidamente a los grupos de investigación con los cuales compartí no sólo científicamente sino a nivel personal. Al grupo de síntesis orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Específicamente, al Doctor Eugenio Uriarte por acogerme en su laboratorio, permitirme exponer mi proyecto y así iniciar una colaboración muy productiva de cinco años con Saleta, María y Silvia. Quiero rescatar lo más lindo que una persona puede entregar y que fue lo que sentí de parte de

Eugenio su sentido de cooperación, amistad y lealtad. Quiero agradecer a quién me llevó a conocer a tan lindo grupo el Doctor Eduardo Sobarzo quién se aproximó a nosotros con las “cumarinas” y ese fue el primer paso para el surgimiento de nuevas investigaciones.

Al grupo de investigación del Doctor Frederick Villamena en Davis Heart and Lung Research Institute, Ohio State University, EEUU. Esta pasantía fue clave en el establecimiento de una cooperación, fruto de la cual publicamos el paper de esta investigación y otros en concomitancia con el grupo del Doctor Uriarte.

Quiero dar las gracias a todas las personas que me ayudaron en esta investigación al Doctor Rodrigo Montecinos por todo ese año en que estuve inserta en el mundo de los liposomas y dinámica molecular de membranas lipídicas, por su honestidad, amistad y trabajo leal. Al Doctor Eduardo Silva quien nos proporcionó el equipo de ultrafiltración.

Al Doctor Javier Morales cuyo aporte en el proceso de creación de este proyecto fue fundamental, por su buena disposición y por proveernos los “ghost” para el desarrollo de una de las pruebas de esta tesis.

Quiero agradecer al Doctor Gerald Zapata por acompañarme todo este tiempo, por su aporte teórico computacional que fue parte de esta investigación y del paper que publicamos en conjunto. Sin embargo, estos agradecimientos quedan cortos al lado de la gratitud que siento por creer siempre en mí, por las

confidentes conversaciones y la fuerza que me entregó especialmente en momentos frágiles de este ciclo. Quiero extender mis agradecimientos a la Doctora Carolina Jullian por estar siempre pendiente de cómo me sentía.

Por otra parte, si nos ponemos a pensar que pasa en los primeros cinco años de vida de una persona podemos encontrar muchos eventos importantes como aprender a leer, a amarrarse los zapatos, ir al colegio e interactuar con pares. Es una etapa muy linda de nuestro crecimiento donde la familia es la que promueve todo.

Ahora, si hago el mismo análisis pero con estos cinco años de doctorado pienso en los días sin dormir, las horas en los laboratorios, la alegría de un buen resultado y el aguante para los malos, los diferentes lugares en los cuales viví y las personas que he conocido algunas de ellas siguen en mi corazón. Y de este análisis, así como el primero, llego a la misma conclusión la familia lo promueve todo.

Quiero agradecer a mi papá Juan a quien le dedico esta tesis ya que fue el principal apoyo en un momento muy difícil en que no se veía muy bien el horizonte, a mi mamá Ximena por preocuparse de que estuviese bien, a mis hermanas Carola y Paola por jugárselas por completo, por levantarme y decirme que todo saldrá bien. A Camilo por sus visitas, conversaciones, risas y consejos. A Lupe por apoyar desde lejos pero a la vez sentirla muy cerca de mi vida. A Patty por llamar siempre, al Seba, Gino, Claudio y por qué no al Ginito.

A mi primo Beto por tantas conversaciones, las combativas y las de domingo en la mañana escuchando música y recordando a la abuela e historias familiares que marcaron nuestras vidas.

Finalmente quiero agradecer a todos mis amigos: Yenni, Gaby, Jime, Yes, la maravillosa Claudia Rodríguez, Sami, Demian, Cristian Cerón, Ale, Rorro, Javo, Manu, Faby, Agus (Chiloé), Pilar, Yoyi, Edu, Jael, Julie, Nelson, Elias, Giancarlo, Cristian Menzel, a Natasha y a los maravillosos amigos del taller literario de escritura creativa y poesía Moda & pueblo, al poeta Diego Ramírez y a los amigos chilenos en Columbus, OH.

Resumen

La presente tesis doctoral abarca el estudio de siete derivados de cumarina, monohidroxilados y dihidroxilados en sistemas homogéneos y modelos de membranas lipídicas.

Los derivados fueron electroactivos al estudiarlos mediante voltametría cíclica, donde se evidenció menores potenciales de oxidación para las dihidroxicumarinas con grupo catecol. La generación de radicales libres producto de la oxidación de estos compuestos fue comprobada a través Resonancia de espín electrónico (REE). Asimismo, los resultados del estudio computacional fueron concordantes con estos datos experimentales.

Todos los derivados presentaron mayor capacidad antioxidante frente a radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) usando como estándar Trolox, siendo los derivados monohidroxilados (**2** y **1**) los de mayor índice ORAC (Ensayo de absorción de radicales de oxígeno) con valores de 9,6 y 6,4 respectivamente. Por el contrario, los derivados con grupo catecol presentaron menores índices en comparación con los derivados monohidroxilados.

Los órdenes de reacción para los compuestos **1** y **3** frente a radicales peroxilo fueron fraccionarios, indicando un mecanismo de reacción complejo. Asimismo, la estequiometría de reacción fue 4:1 $\text{ROO}\cdot$ por cada derivado **1** o **3**. Se descartó la generación de peróxido de hidrógeno y reacciones en cadena

mediante el ensayo FOX y medidas de consumo de oxígeno. A partir de los perfiles cinéticos y los valores de índices ORAC usando las sondas piranina y rojo de pirogalol se observó la baja reactividad de ambos compuesto frente a ROO•. Mientras que en el caso de ORAC-FI, la sonda fluoresceína es menos reactiva que los derivados **1** y **3** frente a radicales peroxilo. Por tanto, se propuso la generación de radicales alcóxilo a partir de la formación y descomposición del tetrámero (ROOOOR) siendo estos radicales los que reaccionarían con los derivados y/o sus radicales libres.

Al contrario, la capacidad antioxidante evaluada a través de REE frente a radicales hidroxilo fue dependiente del número de grupos hidroxilo y valores de pKa, siendo mayor para los compuestos con grupo resorcinol y catecol.

Finalmente, los valores de pseudo constante de asociación con membranas de liposomas para ambos derivados fueron 236 ± 16 y 1846 ± 275 , respectivamente. Asimismo, los porcentajes de asociación evaluados mediante el ensayo de difusión pasiva a través de membrana (PAMPA) fueron un 93,7% para el derivado **1** y un 94,2% para el derivado **3**. La simulación a través de dinámica molecular fue concordante con estos datos experimentales. De igual forma, la incorporación y posterior estudio preliminar de protección de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno frente a ROO• en membranas de eritrocitos siguió la misma tendencia que en sistemas homogéneos.

Abstract

This doctoral thesis deals with the study of seven monohydroxyl and dihydroxy synthetic coumarin derivatives in the presence of a homogeneous system and in lipid membrane models.

All derivatives were electroactives; however, coumarin derivatives bearing a catechol group displayed lower oxidation potentials when compared to monohydroxylcoumarins. The detection of free radicals as products of the oxidation process was carried out by means of Electron Spin Resonance (ESR). In addition, these experimental results were further corroborated by computational chemistry experiments which were in agreement with the experimental data.

The antioxidant capacity of the derivatives against peroxy radicals ($\text{ROO}\cdot$) was carried out employing ORAC methodology (Oxygen Radical Absorbance Capacity). The derivatives showed better ORAC indexes than the standard molecule used Trolox. Two monohydroxylcoumarins (**1** and **2**) displayed the higher values, i.e. 9,6 and 6,4, respectively. On the contrary, coumarin bearing catechol group and resorcinol substituent showed lower ORAC indexes.

The reaction between compounds **1** and **3** against $\text{ROO}\cdot$ yield fractional reaction orders with a reaction stoichiometry of 4:1 between the peroxy radical

and the antioxidant molecule indicating a complex mechanism. The overproduction of hydrogen peroxide and additional chain reactions were discarded. The use of other two probe molecules such as Pyranine and Red pyrogallol in ORAC assays suggests a lower reactivity of both derivatives against ROO• generating alcoxyl radicals that react in turn with the above-mentioned coumarins and/or their corresponding free radicals. Also, ORAC-FI kinetic profiles are explained due to the fluorescein probe is less reactive than those compounds.

On the contrary, the evaluation using ESR exhibits different antioxidant behavior against hydroxyl radicals, the results showed dependence in the number of hydroxyl groups and in their pKa values. However, the latter is the more important variable due to the fact that experimental condition where set up at pH 8.

Finally, the interaction of compounds **1** and **3** with lipid membrane was corroborated by means of pseudo associations constant values of 236 ± 16 ; 1846 ± 275 and PAMPA studies with 93,5 % and 94,1 % of each derivatives, respectively that remains on lipid phase. The molecular dynamics studies were in agreement with the experimental results. At the same time, additional studies of consumption and/or oxidation of the fluorescent probe 1,6-diphenil-1,3,5-hexatriene by ROO• in red blood cells (ghost) displayed the same trends compared to the homogeneous system.

Tabla de contenido

Agradecimientos	II
Resumen	VI
Abstract.....	VIII
Listado de acrónimos.....	XII
Índices de figuras.....	XV
Índice de tablas.....	XXI
Introducción	1
Moléculas en estudio	10
Hipótesis	11
Objetivos generales	12
Objetivos Específicos.....	13
Materiales y métodos.....	15
Resultados y discusión	34
Discusión general	120
Conclusiones	126
Publicación.....	128
Participación en congresos durante el programa de doctorado.....	129

Becas adjudicadas durante el programa de doctorado.....130

Referencias.....131

Listado de acrónimos

ERO: Especies reactivas de oxígeno

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

RBC: Glóbulos Rojos

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FRAP: Ensayo de poder reductor de hierro

BDE: Entalpía de disociación de enlace

REE: Resonancia de espín electrónico

PBN: N-ter-butil- α -fenilnitrona

ORAC: Ensayo de absorción de radicales de oxígeno

FI: Fluoresceína

AAPH: (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro)

Py: Piranina

PGR: Rojo de pirogalol

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

DAD: Detector de arreglo de diodos

FOX: método de oxidación ferrosa de anaranjado de xilenol

DMPO: 5,5-dimetil-1-pirolin-N-óxido

MMFF: Métodos de mecánica molecular

DFT: Teoría de los funcionales de densidad

PCM: Modelo continuo polarizable

ZPE: Energía de punto cero

NPA: Análisis de población aproximado

ArOH: Molécula antioxidante

HAT: Transferencia de átomo de hidrógeno

SET-PT: Transferencia de un electrón seguido de transferencia de un protón

SPLET: Transferencia de protón seguido de transferencia de un electrón

PA: Afinidad de protón

I_p: Potencial de ionización

PAMPA: Ensayo de traspaso de membranas por difusión pasiva

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

EF: Esfingomielina

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

E_{pa}: Potencial de pico anódico

E_{pc}: Potencial de pico catódico

E_{1/2}: Potencial de pico medio

I_{pa}: Corriente de pico anódico

I_{pc}: Corriente de pico catódico

AUC: Área bajo la curva

FOH: Fluoresceína reducida

FO•: Radical fluoresceil

v₀: Velocidad inicial

HOMO: Orbital molecular ocupado de mayor energía

Índices de figuras

Figura 1. Estructura de (2H)-1-benzopiran-2-ona.	1
Figura 2. Vías metabólicas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno.	3
Figura 3. Generación de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton.	4
Figura 4. Estructura química de α -tocoferol.	7
Moléculas en estudio	9
Figura 5. Derivados de monohidroxycumarina estudiados en esta investigación.9	
Figura 6. Derivados de dihidroxycumarina estudiados en esta investigación. ...	10
Figura 7. Esquema de los diferentes mecanismos antioxidantes y los parámetros que los definen.	24
Figura 8. Voltamograma cíclico para el compuesto 4 monohidroxilado (a) y compuesto 5 dihidroxilado (b).	35
Figura 9. Voltamograma cíclico para el derivado 3 a velocidad de barrido 250 mV/s (negro) y 100 mV/s (rojo).	35
Figura 10. Relación lineal entre el cociente de I_{pa} y $v^{1/2}$ versus velocidad de barrido (v) V/s. Derivado 1 (a) 3 (b)	36
Figura 11. Voltamograma cíclico para el compuesto 6 (a) y compuesto 7 dihidroxilados (b).	37
Figura 12. Parámetros I_{pa}/I_{pc} (a) y $I_{pa}/v^{1/2}$ (b) versus velocidad de barrido (v)	38
Figura 13. Gráfico corriente de pico anódico versus velocidad de barrido.	40

Figura 14. Estructura del atrapador de spín α -fenil-N-terbutil-nitrona (PBN). ...	42
Figura 15. Espectro REE del espín aducto formado por el radical del derivado 1 en presencia del atrapador PBN.....	43
Figura 16. Proceso de formación de quelato en la oxidación de un grupo catecol.	44
Figura 17. Espectros REE experimental en negro y simulado en rojo para el radical generado en los derivados (a) 3; (b) 6 en presencia de $ZnCl_2$. Los espectros simulados fueron obtenidos utilizando el software SimFonia versión 1.25.....	45
Figura 18. Espectros REE experimental en Negro y simulado en rojo para el radical generado en el derivado 7 en presencia de $ZnCl_2$. El espectro fue simulado utilizando el software SimFonia Versión 1.25	46
Figura 19. Estructura del compuesto estándar Trolox.	48
Figura 20. Perfiles cinéticos del consumo de FI inducido por $ROO\cdot$ en presencia del compuesto 1 (a); compuesto 2 (b); compuesto 4 (c) y compuesto 5 (d). Los colores indican diferentes concentraciones de derivados de hidroxycumarina. Negro: Control; rojo: 0,5 μM ; verde: 1 μM ; azul: 1,5 μM ; celeste: 2,0 μM y violeta: 2,5 μM	49
Figura 21. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) vs concentración de hidroxycumarina 1 (a); Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) vs concentración de Trolox (b). $R^2= 0,9960$ y $R^2= 0,9553$	51
Figura 22. Molécula sonda fluoresceína	54

Figura 23. Dependencia del valor de índice ORAC-FI para los derivados de monohidroxycumarina (a) y dihidroxycumarina (b) <i>versus</i> potencial de oxidación, sobre cada punto se señala el derivado.	57
Figura 24. Valores sigma Hammet (σ) de un grupo hidroxilo aromático. Un sustituyente hidroxilo en un anillo aromático tiene un efecto electroattractor en posición <i>meta</i> ($\sigma=+0,12$) y un efecto electrodonor en la posición <i>orto</i> y <i>para</i> ($\sigma=-0,37$)	59
Figura 25. Estructura química del derivado 7-hidroxycumarina.	60
Figura 26. Perfiles cinéticos del consumo de FI inducido por ROO• en presencia del derivado 7-hidroxycumarina. Negro: Control; rojo: 0,5 μ M; verde: 1 μ M; azul: 1,5 μ M; celeste: 2,0 μ M.....	61
Figura 27. Estructura del derivado 4-metil-5,7-dihidroxycumarina.....	62
Figura 28. Perfiles cinéticos del consumo de FI inducido por ROO• en presencia del derivado 5,7-dihidroxi-4-metil-cumarina.	63
Figura 29. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) vs concentración de 5,7dihidroxi-4-metil-cumarina. $R^2=0.98738$	63
Figura 30. Estructuras derivados 1 (a) y 3 (b).....	68
Figura 31. Perfil cinético del consumo de Py inducido por ROO• en presencia del derivado 1. Negro: Control; azul: 2 μ M; verde: 4 μ M; violeta: 7 μ M; rojo: 10 μ M.....	69
Figura 32. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) <i>versus</i> concentración de 1. $R^2= 0,9564$	70

Figura 33. Perfil cinético del consumo de Py inducido por ROO• en presencia del derivado 3. Concentraciones: negro: control; rojo: 0,5 μM; azul 1 μM; verde 2 μM; violeta 3 μM.	71
Figura 34. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC _{Neta}) <i>versus</i> concentración de 3. R ² =0,9882.....	71
Figura 35. Cinética de consumo de hidroxycumarina 1 (a) y 3 (b) promovido por radicales peroxilo, monitoreada a través de medidas de fluorescencia.	76
Figura 36. Cromatogramas para el consumo de los derivados 1 y 3 por oxidación debido a radicales peroxilo, en el cual la flecha indica el transcurso del tiempo de reacción.	77
Figura 37. Dependencia de la velocidad inicial de consumo de los compuestos 1 (a) y 3 (b) con su concentración inicial.....	78
Figura 38. Gráfico Log Velocidad inicial V ₀ <i>versus</i> Log concentración derivado 1 y 3 (a y b). R ² = 0.78735; R ² =0.98068.	79
Figura 39. Gráfico de consumo de oxígeno a partir de la reacción de 1 y 3 con ROO•	83
Figura 40. Formación de peróxido de hidrógeno a partir de un radical semiquinónico.	84
Figura 41. Gráfico de barras de concentración de hidroperóxidos <i>versus</i> muestras a tiempos 20, 40 y 60 minutos de reacción.	85
Figura 42. Gráfico de concentración de hidroperóxido <i>versus</i> tiempo de reacción para el derivado 1 y AAPH.....	86

Figura 43. Espectros REE para el aducto DMPO-OH (línea gris) en ausencia de derivados. Espectro REE para el aducto DMPO-OH en presencia de derivados 1 (a) y 5 (b).	89
Figura 44. Gráficos de intensidad de fluorescencia versus pH para ambos derivados.	93
Figura 45. Análisis NPA obtenida para los compuestos 1,2 ,4 y 5.....	98
Figura 46. Análisis NPA obtenida para los compuestos 3, 6 y 7.....	99
Figura 47. Gráfico densidad de masa para el sistema DPPC: 1.....	109
Figura 48. Imagen dinámica Compuesto 1 en membrana de DPPC.	110
Figura 49. a) Parámetros de orden determinados para el sistema DPPC presencia y ausencia de 1. b) Parámetros de orden obtenidos experimentalmente para DPPC y la mezcla con fosfolípidos insaturados.	111
Figura 50. Gráfico densidad de masa para el sistema DPPC: 3.....	112
Figura 51. Imagen de la dinámica molecular del sistema DPPC: 3	113
Figura 52. a) Parámetros de orden determinados para el sistema DPPC presencia y ausencia de 3. b) Parámetros de orden obtenidos experimentalmente para DPPC y la mezcla con fosfolípidos insaturados.	113
Figura 53. Localización de sonda DPH en el sistema DPPC (A) y DPPC: EF (B)	115
Figura 54. Cinéticas de consumo de DPH en membranas de eritrocitos en ausencia y presencia de compuesto 1 (n=3).	117

Figura 55. Cinéticas de consumo de DPH en membranas de eritrocitos en ausencia y presencia de compuesto 3. (n=3) 118

Índice de tablas

Tabla 1. Potenciales de oxidación y reducción <i>versus</i> electrodo de referencia Ag, AgCl/ KCl obtenidos para los compuestos en estudio.	41
Tabla 2. Valores Índices ORAC-FI obtenidos para los derivados en estudio. (n=3)	52
Tabla 3. Valores de estequiometría de reacción determinada a través de la ecuación 4 a la máxima concentración del ensayo ORAC-FI para cada derivado. (n=3)	66
Tabla 4. Índices ORAC para los compuestos 1 y 3 utilizando las sondas FI, Py y PGR.	73
Tabla 5. Índices ORAC-FI para los derivados en estudio e información sobre las propiedades fotofísicas de los derivados.	74
Tabla 6. Porcentajes de disminución de la señal del espín aducto DMPO-OH en presencia de las moléculas en estudio.	91
Tabla 7. Valores de Potencial de oxidación, $\Delta G_{\text{oxid}, 298 \text{ K}}$ y energías HOMO para las moléculas en estudio.	96
Tabla 8. Valores de los parámetros BDE, IP, PDE, PA y ETE obtenidos a partir de los valores teóricos para los conformeros de menor energía.	104
Tabla 9. Valores de pseudo constante de asociación para el compuesto 1 y 3 en liposomas de DPPC y DPPC:EF en una razón 50:50 (n=3).	107

Introducción

Las cumarinas o benzo- α -pironas son compuestos heterociclos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y granos. Su estructura base está conformada por un anillo benceno fusionado a un anillo pirona con un grupo carbonilo en la posición 2 (Figura 1). Hasta la fecha, cerca de 1300 derivados de cumarina han sido extraídos e identificados principalmente desde plantas y especias como la lavanda, menta y canela^[1-3], frutas^[4] y algunas raíces.^[5]

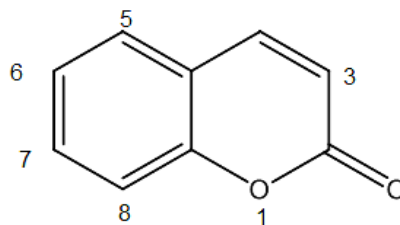


Figura 1. Estructura de (2H)-1-benzopiran-2-ona.

Poseen numerosas actividades biológicas. Tanto las extraídas de plantas como las sintetizadas.

Esta investigación se ha centrado en los derivados hidroxilados, cuyas propiedades farmacológicas han sido estudiadas destacando su actividad como antimicrobianos^[6, 7], antiinflamatorios^[8-11], anticoagulantes,^[12] inhibidores de la enzima monoaminoxidasa,^[13, 14] inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa,

antineoplásicos^[15-19] y como posible alternativa para el tratamiento de la diabetes.^[20]

Aproximadamente un 2% del oxígeno molecular consumido durante la respiración fisiológica normal se convierte a través de un proceso de reducción en anión radical superóxido $O_2^{\cdot-}$.

El anión radical superóxido es considerado el precursor de la mayoría de las especies reactivas presentes en nuestro organismo (figura 2). Dentro de esta concepción se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden ser radicalarias, aniónicas o neutras entre las que destacan el radical hidroxilo OH^{\cdot} , radicales peroxilo ROO^{\cdot} , radical alcoxilo RO^{\cdot} , $HOCl$ y peróxido de hidrógeno H_2O_2 .

La concentración de estas especies se encuentra regulada por mecanismos antioxidantes presentes en el organismo humano de tipo enzimático y no enzimático. Estos incluyen la enzima superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Mientras que los antioxidantes no enzimáticos son el glutatión, la bilirrubina, la coenzima Q, α -tocoferol y el ácido lipoico.^[21]

En situaciones de desbalance, ya sea por sobreproducción de especies reactivas y/o disminución de mecanismos antioxidantes, se genera el estrés oxidativo.

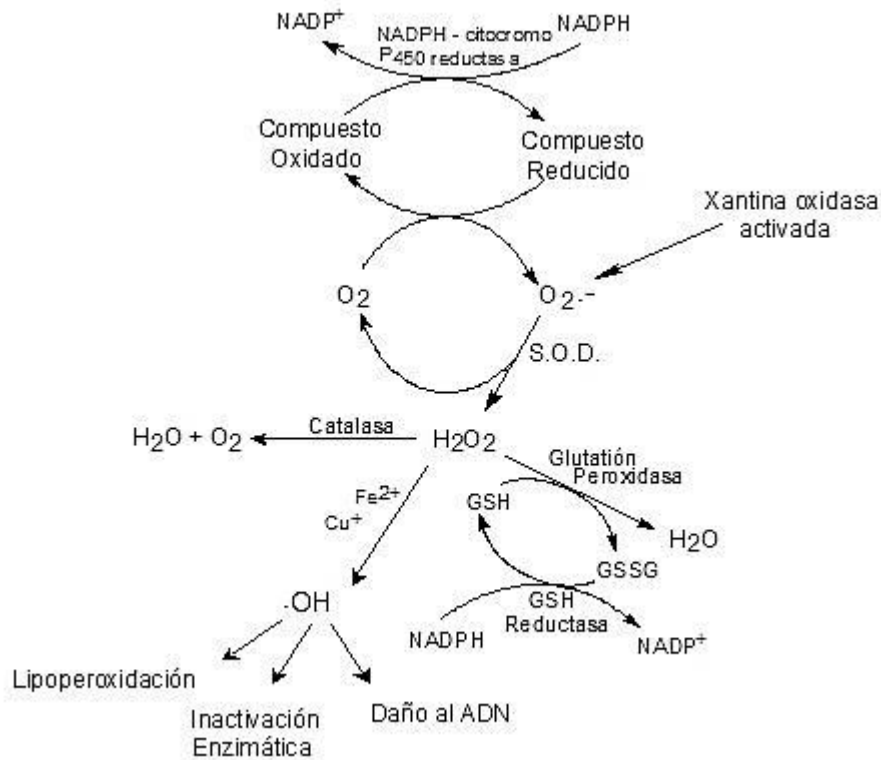


Figura 2. Vías metabólicas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno.

Una de las especies deletéreas más reactiva es el radical hidroxilo cuyo potencial de reducción es de 2,31 V (OH^\bullet , $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$). Además, participa de reacciones con compuestos de interés biológico con constantes de velocidad del orden de 10^9 a $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este radical se genera en el organismo humano vía reacción de Fenton (figura 3) e inicia procesos tales como peroxidación de ácidos grasos, lipoproteínas, proteínas externas y cabezas de fosfolípidos.^[21]

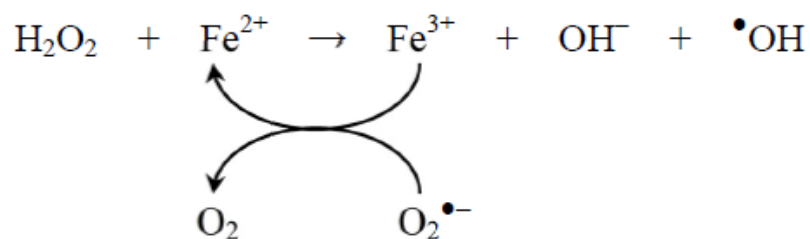
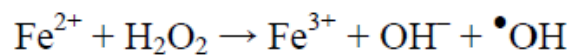


Figura 3. Generación de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton.

En este proceso oxidativo se producen radicales centrados en carbono, los cuales en condiciones aeróbicas originan radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$). Esta etapa da paso a reacciones en cadena generando especies deletéreas las cuales pueden modificar las propiedades físicas de las membranas incluyendo su permeabilidad afectando el empaquetamiento de lípidos como colesterol y proteínas.^[22] Finalmente la reacción entre dos radicales peroxilo es una de las etapas de término de la lipoperoxidación.

Dentro de las células más abundantes y especializadas se encuentran los eritrocitos (RBC). La principal función de estos es el transporte de oxígeno (O_2) y la regulación de la producción de dióxido de carbono (CO_2) a través de la hemoglobina, la cual representa más del 95% de proteína citoplasmática.^[23] La membrana de los eritrocitos está formada de una bicapa lipídica compuesta por un 40% de lípidos, siendo cerca de la mitad de estos insaturados. La estructura de la bicapa lipídica es fundamental para la organización de la red del

citoesqueleto en los glóbulos rojos.^[24] A pesar de carecer de mitocondria, continuamente se producen especies reactivas de oxígeno a través de la autooxidación de la hemoglobina. Esto se debe a la alta presión de oxígeno en la sangre arterial y su alto contenido de hierro hemo, generando anión radical superóxido provocando que los glóbulos rojos sean susceptibles a daño peroxidativo.^[24-26]

Debido a los daños que produce el estrés oxidativo asociado a importantes enfermedades (más de 100) junto con procesos oxidativos relacionados con el envejecimiento, se ha propuesto que el incremento de antioxidantes suplidos en forma exógena, proveniente de frutas y vegetales, representaría un mecanismo de defensa adicional a los mecanismos endógenos.^[27]

Parte importante dentro del grupo de compuestos con actividad antioxidante se encuentran los derivados fenólicos tales como los flavonoides o benzo- γ -pirona, antocianinas, lignanos y ácidos hidroxicinámicos.^[28, 29] Los antioxidantes pueden ejercer diferentes funciones como la supresión de la formación de especies reactivas, reducción de hidroperóxidos y peróxidos y quelación de iones metálicos.^[21]

En estudios de relación estructura-actividad de flavonoides se ha planteado que el número de grupos hidroxilos y la presencia de sustituyentes electrodonores en su estructura es un factor que influye en su capacidad

antioxidante.^[30] Junto a esto, se ha establecido que los potenciales de oxidación podrían contribuir al entendimiento de la actividad antioxidante, es decir, que la eficacia del antioxidante es alta cuando el potencial de pico anódico es bajo.^[28]

Asimismo, se ha estudiado el rol protector ejercido por flavonoides en modelos de membrana lipídica, postulando que la actividad antioxidante de flavonoides es dictada por sus características estructurales, su localización en la membrana, su interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos en la interfase lípido-agua, las condiciones de inicio del proceso oxidativo y su capacidad de transferir un átomo de hidrógeno asociado a la reducción de la velocidad de oxidación de cada familia de compuestos.^[29-34]

Dentro de los derivados fenólicos con propiedades antioxidantes se encuentra el resveratrol, el cual es extraído principalmente de uvas y subproductos de estas. Su estructura presenta dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena alifática insaturada. Este ordenamiento ha permitido el estudio de sus propiedades antioxidantes frente a lipoperoxidación en modelos de membranas lipídicas^[35] y en eritrocitos donde se observó la inhibición significativa de este proceso oxidativo.^[36] Uno de los mecanismos antioxidantes endógenos presentes en las membranas celulares es el α -tocoferol o vitamina E. Estructuralmente está constituido por un núcleo cromanol con un grupo polar OH y una cadena hidrofóbica (figura 4). La cadena hidrofóbica asegura que la

vitamina E se encuentre principalmente localizada en la membrana ejerciendo protección antioxidante.^{[37],[21]}

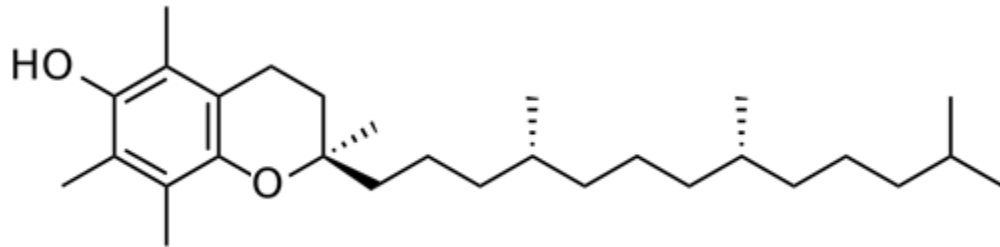


Figura 4. Estructura química de α -tocoferol.

La similitud estructural del α -tocoferol con los derivados de hidroxycumarina ha proporcionado una guía para el estudio de estos compuestos fenólicos como potenciales antioxidantes.

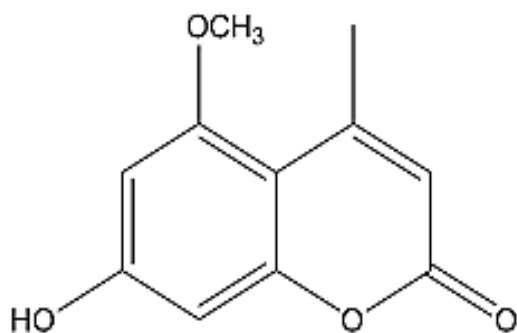
La actividad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina ha sido estudiada a través de diferentes ensayos. Los cuales establecieron que el compuesto 3-hidroxycumarina y los derivados de 4-hidroxycumarina poseen actividad antioxidante frente a HOCl, DPPH, ONOO⁻ y O₂^{•-}. Junto a esto se estableció que los derivados dihidroxilados en posición 5, 6 y 7 presentan actividad comparable con antioxidantes conocidos como la quercetina. Además la sustitución con grupos electrodonores en posición 3, 7 y 8 sería un factor que modifica su actividad.^[12, 38-42] Asimismo, el ensayo del poder de reducción de

Fe^{3+} más conocido como FRAP permitió concluir que el derivado 4-metil-7,8-dihidroxicumarina posee capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo producido por doxorubicina.^[43]

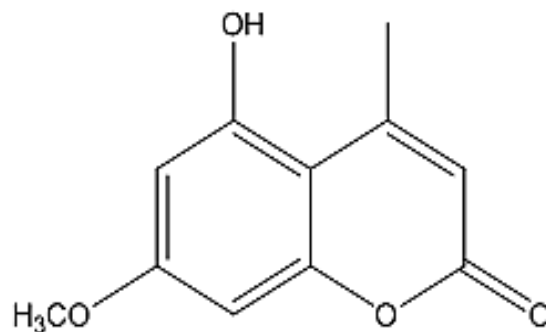
Estos derivados han sido estudiados frente a lipoperoxidación mediante estudios computacionales y experimentales estableciendo que el anillo α -pirona incrementa la actividad antioxidante junto con la sustitución en posición 7 y la presencia del grupo catecol, siendo más importante la sustitución en posición *orto* comparado con *meta*.^[6, 29, 44-46] A través de datos computacionales se estableció que los valores de entalpía de disociación de enlace (BDE) oxígeno-hidrógeno es el parámetro energéticamente favorecido que permite explicar termodinámicamente el mecanismo antioxidante.^[46]

De acuerdo a los antecedentes antes presentados este proyecto de tesis doctoral ha sido diseñado para estudiar la actividad antioxidante de siete derivados sintéticos de hidroxycumarina. Los derivados fueron seleccionados por sus patrones relacionados con la capacidad antioxidante como número de grupos hidroxilo en el anillo B, la presencia del grupo catecol y resorcinol, sustituyentes con propiedades electroattractoras y electrodonoras y similitud del esqueleto de los derivados con el núcleo cromanol presente en la estructura de la vitamina E. En base a los resultados en sistemas homogéneos se estudió el efecto en modelos de membranas lipídicas.

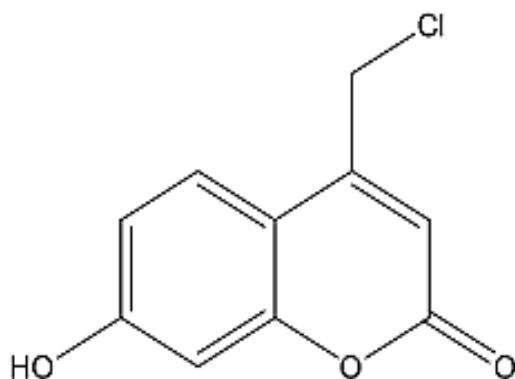
Moléculas en estudio



7-hidroxi-5-metoxi-4-metil-2H-croman-2-ona



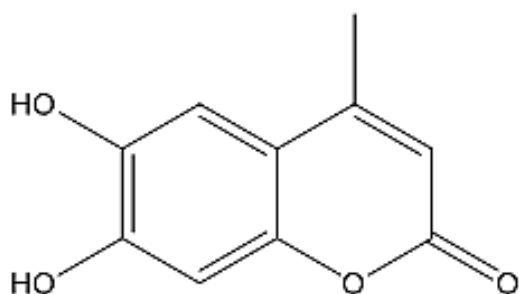
5-hidroxi-7-metoxi-4-metil-2H-croman-2-ona



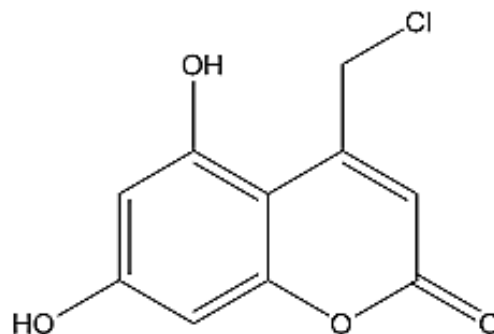
4-(clorometil)-7-hidroxi-2H-croman-2-ona

Figura 5. Derivados de monohidroxycumarina estudiados en esta investigación.

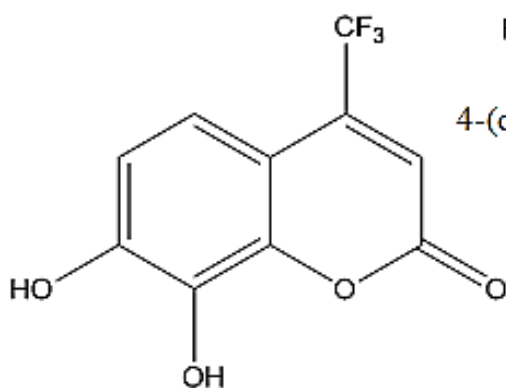
Moléculas en estudio



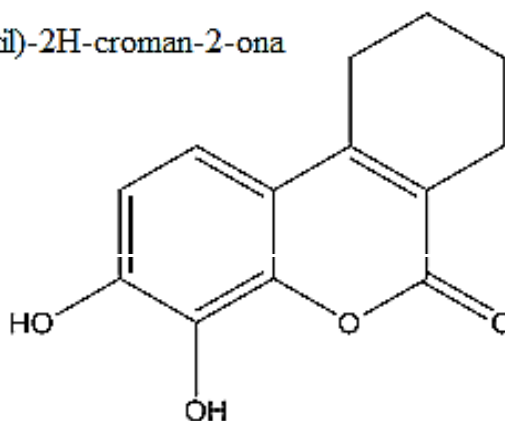
6,7-dihidroxi-4-metil-2H-croman-2-ona



4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2H-croman-2-ona



7,8-dihidroxi-4-(trifluorometil)-2H-croman-2-ona



3,4-dihidroxi-7,8,9,10-tetrahidro-6H-benzo [c] croman-6-ona

Figura 6. Derivados de dihidroxicumarina estudiados en esta investigación.

Hipótesis

El incremento en el número de grupos hidroxilo presentes en el esqueleto de los derivados de benzo- α -pirona produce un aumento en su actividad antioxidante de acuerdo al siguiente orden: monohidroxilo, resorcinol y catecol. Debido a sus patrones estructurales este comportamiento antioxidante se evidencia tanto en sistemas homogéneos como en modelos de membranas lipídicas.

Objetivos generales

Evaluar las propiedades antioxidantes de los compuestos en estudio frente a diversas especies reactivas en sistemas homogéneos y modelos de membrana lipídica.

Correlacionar las actividades antioxidantes de la familia en estudio con parámetros fisicoquímicos experimentales y teóricos.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la oxidación de los derivados de hidroxycumarina mediante voltametría cíclica y caracterizar las especies radicalarias a través de Resonancia de Espín Electrónico.
2. Evaluar las propiedades antioxidantes de los derivados de hidroxycumarina en sistema homogéneo (tampón fosfato; pH 7,4) mediante ensayo ORAC y Resonancia de Espín electrónico.
3. Caracterizar las propiedades electrónicas y conformacionales de los derivados de hidroxycumarina en estado neutro y radicalario utilizando metodologías de la mecánica cuántica. Racionalizar los ensayos antioxidantes con parámetros determinados a partir del estudio teórico.

4. Determinar el coeficiente de partición liposoma/tampón fosfato pH 7,4 de los derivados de hidroxycumarina y estudiar la difusión a través de membrana mediante el ensayo pampa.
5. Correlacionar el comportamiento de los derivados de hidroxycumarina en modelos de membranas lipídicas con los resultados del estudio a través de dinámica molecular.
6. Estudiar el comportamiento antioxidante de los derivados frente a especies reactivas de oxígeno en liposomas y membranas de eritrocitos.

Materiales y métodos

Estudio de la oxidación de los derivados de hidroxycumarina

El estudio electroquímico de los derivados de hidroxycumarina se realizó mediante la técnica de Voltametría Cíclica. Los voltamogramas fueron obtenidos a diferentes velocidades de barrido en un intervalo de 50-750 mV/s, en un equipo potenciostato/galvanostato VersaSTAT 3 provisto del software V3-studio electrochemistry. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en una celda constituida por tres electrodos: Electrodo auxiliar de alambre de platino, electrodo de referencia de Ag, AgCl/KCl (3,5 M) y electrodo de trabajo de carbón vítreo en solvente tampón fosfato a una concentración de 50 mM (pH 7,4). Las soluciones madre para todos los derivados fueron preparadas en metanol y llevadas mediante dilución a una concentración final en celda de 1 mM.

Caracterización de las especies radicalarias de los derivados en estudio a través de Espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico (REE)

Las especies radicalarias fueron generadas a través de una oxidación química o mediante una oxidación electrolítica *in situ*. En esta última utilizando perclorato de tetrabutilamonio como electrolito soporte y alambre de platino como electrodo de trabajo. Los compuestos (2 mM) dihidroxilados fueron previamente tratados con 1,5 M de Cloruro de Zinc.^[47]

Los radicales libres derivados de cada compuesto dihidroxilado fueron formados a partir de la reacción de los derivados en estudio con peróxido de hidrógeno al 30 % e hidróxido de sodio (25 mM). Asimismo, la generación de radicales libres a partir de los derivados monohidroxilados se llevó a cabo a través de la electrólisis de estos compuestos, adicionando al sistema el atrapador de espín N-ter-butil- α -fenilnitrona (PBN) a una concentración de 30 mM. Todos los espectros de REE fueron registrados usando un espectrómetro Bruker ECS 106 de banda X (9,85 GHz) equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Los espectros experimentales fueron simulados a través del software WINEPR Simphonia versión 1,25.

Evaluación de la capacidad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina mediante el ensayo ORAC fluoresceína (ORAC-FI)

Para determinar la capacidad antioxidante de los derivados en estudio se realizó el ensayo ORAC-FL, el cual mide la capacidad antioxidante frente a la presencia de radicales peroxilo, en comparación al estándar Trolox (ácido-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) utilizando como sonda fluorescente fluoresceína (FI). Todas las medidas fueron efectuadas en un lector de multiplatos Synergy HT Bio-Tek Instruments Inc. Winooski, USA, utilizando placas de poliestireno blanco de 96 platos. Las medidas de emisión de fluorescencia fueron obtenidas a través de la excitación de las muestras a una longitud de onda de 485 nm y un filtro de emisión de 528 nm. La lectura fue controlada utilizando el programa Gen 5.

La reacción fue llevada a cabo en tampón fosfato a una concentración final de 75 mM. Los radicales peroxilo fueron generados a partir de la termólisis a 37°C en presencia de oxígeno del azocompuesto AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina)) (18 mM). La cinética de reacción de fluoresceína con radicales peroxilo fue seguida a través de medidas de fluorescencia (528 nm) en el tiempo, en presencia y ausencia de los derivados en estudio. Las concentraciones de las hidroxycumarinas estuvieron en el intervalo de concentración de 0,3 μM a 7,0 μM .

Estudio de la capacidad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina mediante el intercambio de molécula sonda en ensayo ORAC

Para estudiar la influencia en los valores de índices ORAC al cambiar la molécula sonda se utilizó piranina (ácido-8-hidroxipireno-1, 3, 6-trisulfónico) (Py) y rojo de pirogalol (PGR) a una concentración en celda de 70 nM y 70 μ M, respectivamente. Para el ensayo ORAC-Py, las cinéticas fueron monitoreadas utilizando longitudes de onda de excitación y emisión λ_{exc} = 460 nm, λ_{em} = 510 nm. Todas estas medidas fueron determinadas en un fluorímetro Perkin-Elmer LS-55 equipado con un contenedor de celda con temperatura controlada. Las cinéticas para el ensayo ORAC-PGR fueron observadas a través de medidas de absorbancia a 540 nm en un lector de multiplatos Synergy HT Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA, usando placas de poliestireno transparente de 96 platos.

Las reacciones fueron realizadas en tampón fosfato (75 mM) ajustando el pH a un valor de 7,4. Se seleccionaron dos de los siete derivados de hidroxycumarina en estudio. Esta elección fue en base a la presencia de uno y dos grupos hidroxilo en su estructura. Los compuestos evaluados fueron el compuesto **1** y **3** en un intervalo de concentración de 1,5 a 10 μ M y 0,5 a 3,0 μ M, respectivamente.

Estudio de la cinética de reacción de los derivados de hidroxycumarina con radicales peroxilo

Para esto se seleccionaron cuatro de los siete derivados: las monohidroxycumarinas **1** y **2** junto a las dihidroxycumarinas **3** y **6** con grupo catecol (figura 5 y 6). Las soluciones madre de hidroxycumarina fueron preparadas diariamente en etanol y llevadas a través de dilución a concentraciones variables entre (3 μM a 1000 μM) en tampón fosfato e incubadas a 37° C con AAPH a una concentración final de 18 mM.

La cuantificación del consumo de los derivados en función del tiempo, producido por la incubación con AAPH a 37°C, se efectuó mediante medidas de fluorescencia para concentraciones en el intervalo de 3 - 20 μM . Para concentraciones mayores (entre 50 μM y 1 mM) los ensayos se realizaron utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con un detector de arreglo de diodos (DAD) Agilent 1200 utilizando una columna C18 y fase móvil acetonitrilo: agua a pH 2,1 en proporciones 65:35 y 50:50. Todos los solventes utilizados fueron grado cromatográfico.

Reacción de radicales peroxilo con derivados de hidroxycumarina: Estudio de la presencia de reacciones secundarias

La presencia de reacciones paralelas a la reacción entre derivados de hidroxycumarinas y radicales peroxilo pueden ser del tipo reacción en cadena y/o formación de peróxido de hidrógeno.

La primera fue evaluada a través de medidas de consumo de oxígeno. Esta determinación se efectuó en una celda sellada, la cual contiene una solución de tampón fosfato a una concentración 75 mM a pH 7,4. En primer lugar se adicionó una alícuota de solución madre de AAPH, de manera tal de llegar a una concentración final de 18 mM. Posteriormente, en experimentos diferentes, se adicionó una alícuota de solución madre de hidroxycumarina **1** y **3** obteniendo una concentración en celda de 300 μ M. Los experimentos fueron realizados en un equipo TBR4100 Free radical analyzer con sensor amperométrico de oxígeno ISO-OXY-2. A través de una purga con nitrógeno se comprobó la presencia de oxígeno residual.

A pesar de que la producción de peróxido de hidrógeno se puede estudiar a través de medidas de oxígeno se seleccionó un método específico para detección y cuantificación de hidroperóxidos. El método FOX^[48] permite cuantificar la formación de hidroperóxidos inorgánicos y orgánicos. En este caso en particular se estudió la reacción de la dihidroxycumarina **3** en ausencia y presencia de 18 mM de AAPH a 37 °C. La presencia de hidroperóxidos

inorgánicos fue determinada al adicionar la enzima catalasa 20 U/mg de proteína. Como control negativo se evaluó el derivado 1, monohidroxilado.

Evaluación de la capacidad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina en presencia de radicales hidroxilo mediante REE

Para estudiar la capacidad antioxidante de los compuestos frente a radicales hidroxilo se utilizó el método de tipo fenton no catalítico.^[49] Para ello, a 150 μL de N,N-dimetilformamida se adicionó 50 μL de NaOH (25 mM), 50 μL del atrapador de espín 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-oxido (DMPO, 0,2 M), 50 μL de agua (blanco) y 50 μL de peróxido de hidrógeno al 30 %.

El estudio se realizó en presencia y ausencia de los derivados (4 mM) en un volumen final de 300 μL . Tras 5 minutos de reacción, la celda de REE fue puesta en la cavidad del espectrofotómetro, obteniendo de esta manera el espectro REE. Para evaluar la capacidad antioxidante se cuantificó el porcentaje de apagamiento del radical hidroxilo por comparación de la disminución en la intensidad de la señal del espín aducto DMPO-OH en relación a un espectro en ausencia de molécula antioxidante (blanco).

Caracterización de las propiedades electrónicas y conformacionales de los derivados de hidroxycumarina en estado neutro y radicalario utilizando metodologías de la mecánica cuántica

Para caracterizar los derivados en estudio se realizó una búsqueda conformacional en fase gas mediante métodos de la mecánica molecular (MMFF). Posterior a la elección de los conformeros se realizó una optimización semiempírica PM3 seguido de una optimización a nivel de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) usando el funcional híbrido B3LYP y combinado con el conjunto de funciones base con doble función de polarización 6-31G (d, p) usando el software GAUSSIAN' 03.

Los modelos computacionales basados en DFT son particularmente útiles para el análisis de propiedades magnéticas para especies neutras y radicalarias.^[50-54]

Las estructuras obtenidas fueron estudiadas en solución acuosa vía modelo continuo polarizable (PCM) mediante un cálculo de energía single-point a un nivel B3LYP/6-31G(d).^[55] Las energías fueron corregidas utilizando como punto cero de energía vibracional un factor de 0.9806 (ZPE).^[56] Las energías libres fueron determinadas de un cálculo térmico y corrección entrópica a 298 K, mediante frecuencias de vibración no estandarizadas. Los cambios en la densidad de carga fueron obtenidos de un análisis de población aproximado

(NPA) a través de un single point PCM/B3LYP/6-31G (d)/B3LYP/6-31G+ (d).^{[57,}

58]

Racionalización de los ensayos de capacidad antioxidante con parámetros teóricos

A partir de los conformeros de menor energía se calcularon los valores de los parámetros energéticamente determinantes de los mecanismos antioxidantes. Se han planteado los siguientes mecanismos de reacción entre los antioxidantes (ArOH) y radicales libres: transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). Transferencia de un electrón, este último puede efectuarse secuencialmente, ya sea por transferencia de un electrón seguido de transferencia de protón denominado mecanismo (SET-PT) y otro mecanismo referido a la pérdida de un protón seguido de entrega de un electrón llamado SPLET.

Se ha señalado que los parámetros esenciales para la explicación de la actividad antioxidante son el valor de entalpía de disociación de enlace O-H, el potencial de ionización y la densidad de espín.^[59, 60]

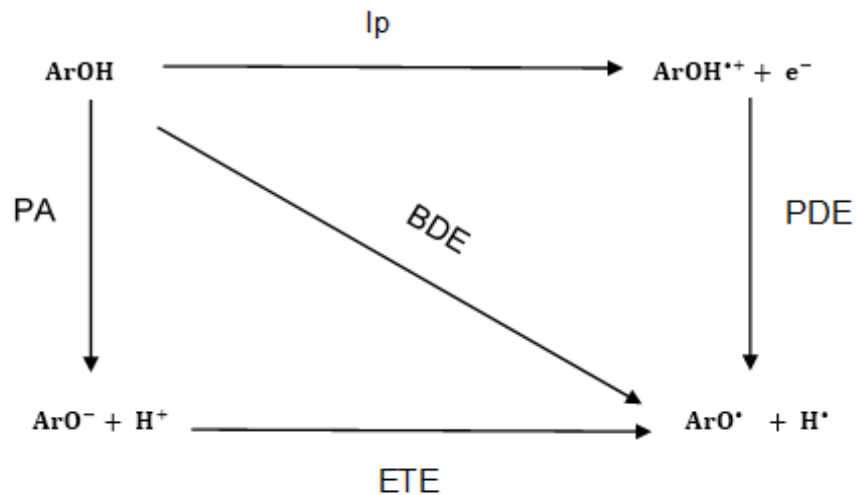


Figura 7. Esquema de los diferentes mecanismos antioxidantes y los parámetros que los definen.

A partir del análisis de la figura 7 es posible plantear parámetros que definen termodinámicamente la ocurrencia de los diferentes mecanismos antioxidantes, estos son la afinidad electrónica (PA), fundamental para el mecanismo SPLET, potencial de ionización (I_p) paso esencial mecanismo SET-PT y entalpía de disociación de enlace (BDE) valor asociado a mecanismo HAT. [46]

Todos los parámetros se calculan de la siguiente forma:

Entalpía de disociación de enlace O-H:

$$BDE = H(\text{ArO}^\bullet) + H(\text{H}) - H(\text{ArOH})$$

Donde:

$H(\text{ArO}\cdot) =$ Entalpía para el radical generado después de la abstracción del átomo de hidrógeno en solvente agua.

$H(\text{H}) =$ Entalpía para el átomo de hidrogeno (-0.49792 Hartree)

$H(\text{ArOH}) =$ Entalpía para la molécula neutra en solvente agua.

Potencial de ionización:

$$IP = H(\text{ArOH}\cdot+) + H(e^-) - H_p$$

Donde:

$H(\text{ArOH}\cdot+) =$ Entalpía del catión radical generado luego de las abstracción de un electrón.

$H(e^-) =$ Entalpía de electrón

$H(\text{ArOH}) =$ Entalpía para la molécula neutra en solvente agua.

Entalpía de disociación de protón:

$$PDE = H(\text{ArO}\cdot) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}^+)$$

Donde:

$H(\text{ArO}\cdot) =$ Entalpía para el radical generado después de la abstracción del átomo de hidrógeno en solvente agua.

$H(\text{H}^+) =$ Entalpía de protón.

Afinidad de protón:

$$PA = H(\text{ArOH}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH})$$

Donde:

(ArOH^-) = Entalpía del anión formado por la transferencia de un protón.

$H(\text{H}^+)$ = Entalpía de protón.

$H(\text{ArOH})$ = Entalpía para la molécula neutra en solvente agua.

Entalpía de transferencia electrónica:

$\text{ETE} = H(\text{ArO}\cdot) + H(\text{e}^-) - (\text{ArOH}^-)$

Donde:

$H(\text{ArO}\cdot)$ = Entalpía para el radical generado después de la abstracción del átomo de hidrógeno en solvente agua.

Estudio de los derivados de hidroxycumarina en modelos de membrana lipídica

Determinación del coeficiente de difusión a través del sistema Pampa/ ensayo de permeabilidad paralela en membrana artificial

Para evaluar la capacidad de los compuestos para traspasar membranas por difusión pasiva se llevó a cabo el ensayo PAMPA. La permeabilidad efectiva de los compuestos se midió a una concentración de 1 mM (sólido disuelto en 20% de Etanol: 80 % tampón fosfato). Igualmente, se utilizó tampón fosfato 75 mM a pH 7,4. Este ensayo se llevó a cabo en una placa doble de 96 platos. La parte superior de la placa contiene la muestra en tampón fosfato. En la parte inferior se forma la membrana tras la adición de 4 μ L de una mezcla de fosfatidilcolina (20 mg/mL) en dodecano hasta la completa volatilización del solvente. Posteriormente, la placa donora se ajusta sobre la placa aceptora, asegurando que la parte inferior de la membrana esté en contacto con la solución tampón. Se cubre e incuba a temperatura de 25° C en ambiente húmedo durante 2 horas bajo agitación a 250 rpm.

Terminado el tiempo de agitación se cuantificó el contenido en ambos compartimentos mediante medidas de absorbancia y sus concentraciones se determinaron usando el coeficiente de extinción molar para cada derivado.^[61]

Determinación del coeficiente de partición liposoma/tampón Tris pH 7,4 de los derivados de hidroxycumarina

Preparación de Liposomas

Los liposomas se prepararon en un balón adicionando 2 mg/mL de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC). La concentración final de fosfolípidos en las suspensiones de liposomas fue en todos los casos 500 μ M. Se adicionó una alícuota de una solución madre de hidroxycumarina de concentración final de 10 μ M. El solvente fue removido por rotaevaporación conectado a una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente hasta obtener una película delgada. Para asegurar la completa eliminación de los solventes el sistema fue dejado toda la noche en un desecador. La hidratación de la película de fosfolípido e hidroxycumarina se realizó en tampón Tris-HCl a pH 7,4 cuya concentración fue de 20 mM conteniendo 0,14 M de NaCl, sonicando hasta obtener una dispersión.

Posteriormente, se efectuaron 15 ciclos de calentamiento-enfriamiento, el primero sobre la temperatura de transición de fase para este fosfolípido $T_m = 42$ ° C, bajo corriente de nitrógeno y enfriamiento con nitrógeno líquido. En este paso se obtienen membranas multilamelares. Por medio de la extrusión cíclica (15 veces) a través de un filtro de 400 nm se logra la formación de liposomas unilamelares. Se seleccionaron liposomas unilamelares grandes dado el alto % de eficiencia de encapsulación de estas estructuras y la eficacia del método

preparatorio que nos permitió reproducir esta estructura de bicapa con precisión.^[62]

La composición lipídica de los liposomas fue modificada adicionando esfingomielinea en una proporción de 50:50. El procedimiento de preparación fue idéntico a las vesículas de DPPC con excepción del calentamiento que se realizó a menor temperatura para evitar la oxidación de la esfingomielinea.

Determinación del coeficiente de reparto

La evaluación del coeficiente de reparto fue realizada utilizando la técnica de ultrafiltración en un equipo Stired cell modelo 8050 de 44,5 mm de diámetro y un cut off de membrana de 1 KDa (~ 0,1 nm).^[63] Las membranas unilamelares fueron ultrafiltradas, posteriormente se determinó la fluorescencia residual en el filtrado (tampón), cuyo valor de intensidad fue interpolada en una curva de calibración para cada derivado.^[64]

Correlación del comportamiento de los derivados de hidroxycumarina en membranas lipídicas y estudio de la fluidez de membranas a través de Dinámica molecular

La simulación del comportamiento de los compuestos **1** y **3** (previamente optimizadas) en membranas de fosfolípidos fue estudiada mediante dinámica molecular. Para esto se utilizó el software GROMACS.^[65-68]

La bicapa lipídica previamente equilibrada fue construida con 128 moléculas de DPPC y 3655 moléculas de agua. Las dimensiones de la caja de simulación en los ejes x, y, z fueron 6,345; 6,345 y 6,779 nm.

En la dinámica molecular se utilizaron los campos de fuerza POLS-UA, cuyas ecuaciones son apropiadas para sistemas que contengan lípidos. Se acomodaron en un ordenamiento azaroso tres moléculas del derivado **1** y **3** en la parte superior e inferior del eje z. Este protocolo fue utilizado para ambos derivados. Se utilizó un modelo isotrópico con una presión de 1 bar en las direcciones x, y, z con un tiempo de 0,1 ps, condiciones de límite periódicas y temperatura constante aplicando el algoritmo Berendsen y baróstato. Se realizó una minimización de energía para remover los contactos erróneos o traslapes. Finalmente, se estableció un tiempo de dinámica de 100 ns.

Estudio de la interacción de derivados de hidroxycumarina frente a especies reactivas en modelos de membrana lipídica

La determinación de la interacción de los derivados **1** y **3** fue evaluada a través de la utilización de la sonda fluorescente 1,6-difenil-1, 3, 5-hexatrieno (DPH), la cual fue incorporada en una concentración final de 6 μM en cada sistemas, ya sea liposomas de DPPC, DPPC: EF (50:50) o membranas de eritrocitos. El proceso oxidativo fue producido a través de la generación de radicales peroxilo mediante la pirolisis de AAPH a 37°C.

La cuantificación del consumo de la sonda DPH en función del tiempo, producido por la incubación con AAPH a 37°C, se efectuó mediante medidas de fluorescencia de DPH (λ exc= 350 nm, λ em= 452 nm) en ausencia y presencia de hidroxycumarinas en un intervalo de concentración entre 5 a 20 μM .^[69]

Preparación de membranas de eritrocitos

Para la preparación de las membranas se utilizaron eritrocitos provenientes de sangre de conejo del Instituto de Salud Pública de Chile. A 10 mL de sangre previamente obtenida se le adicionó solución de citrato de sodio como agente anticoagulante.

Posteriormente, la muestra fue centrifugada por 10 minutos a 16640 g a una temperatura constante de 4° C y luego el pellet obtenido fue dispersado en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 y sometido a iguales condiciones de

centrifugación, repitiendo este proceso de lavado dos veces. Luego, a los eritrocitos limpios se les adicionó 40 mL de solución fosfato 1 mM a pH 7,4.

Esta muestra fue agitada y luego centrifugada por 25 min a 16640 g a una temperatura constante de 4° C. Este ciclo fue repetido 5 veces hasta la obtención de un pellet de color blanco correspondiente a los eritrocitos hemolizados. Finalmente, las membranas obtenidas fueron dispersadas en solución tampón fosfato 0,1 M y refrigerada a 4° C.

Para los ensayos de interacción contra especies reactivas, estas suspensiones de membranas de eritrocitos fueron incubadas por 24 horas con concentraciones variables de derivados de hidroxycumarina de 5 μ M, 15 μ M y 20 μ M.

Análisis estadístico

Los resultados experimentales son expresados como promedio \pm desviación estándar (SEM) acompañados por el número (n) de experimentos usando el programa OriginLab.

Resultados y discusión

Estudio electroquímico de los derivados de hidroxycumarina

El potencial de oxidación es un parámetro que determina la energía necesaria para que un compuesto ceda electrones. Una de las técnicas electroquímicas que ha sido aplicada en el estudio de la oxidación de compuestos fenólicos, tales como flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y derivados de ácido benzoico es la voltametría cíclica. Los valores de potencial de oxidación han sido relacionados con la actividad antioxidante, proponiendo que un bajo potencial de oxidación implica una mayor capacidad antioxidante.^[70-72]

Por esta razón, resulta apropiado iniciar el estudio de la capacidad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina a través de la obtención de los potenciales de oxidación. Estas determinaciones se realizaron en medio prótico, utilizando tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

Bajo estas condiciones, todos los derivados a excepción de los derivados **6** y **7** exhibieron un pico anódico en ausencia de su correspondiente pico catódico (Figura 8a). Incluso derivados dihidroxilados **3** y **5** con grupo catecol y resorcinol (Figura 8b) presentaron igual comportamiento, indicando un proceso de oxidación irreversible.

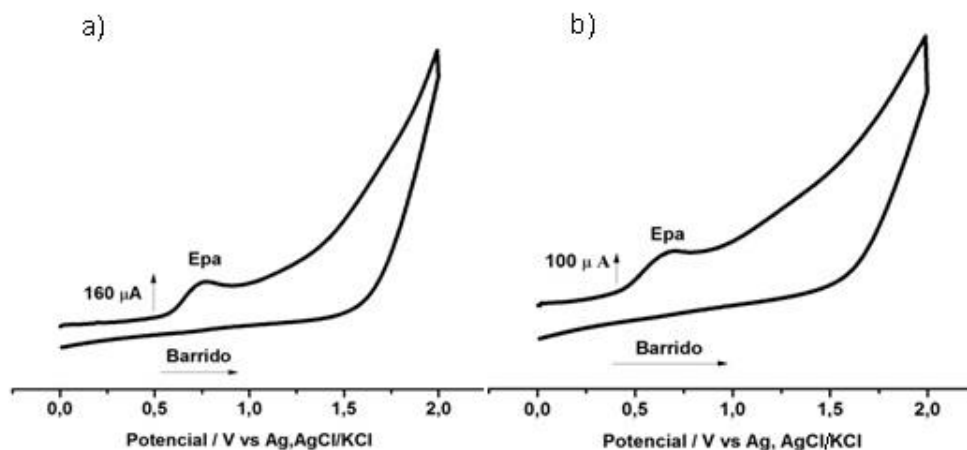


Figura 8. Voltamograma cíclico para el compuesto 4 monohidroxilado (a) y compuesto 5 dihidroxilado (b).

El voltamograma de tipo irreversible en la figura 9 muestra la dependencia de la intensidad de corriente con la velocidad de barrido junto a un desplazamiento en los valores de Epa hacia valores menos positivos. Lo que hace suponer que el producto formado por el proceso oxidativo posee una baja estabilidad.

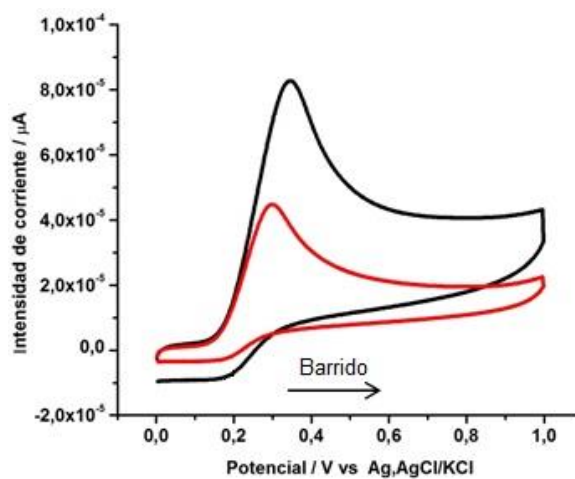


Figura 9. Voltamograma cíclico para el derivado 3 a velocidad de barrido 250 mV/s (negro) y 100 mV/s (rojo).

Todos los derivados exhibieron este comportamiento el cual estaría relacionado con la oxidación del grupo hidroxilo para formar el radical semiquinónico. Posteriormente esta especie puede participar en reacciones de dimerización, pérdida de un protón o de ataque nucleofílico.^[73]

Al graficar el parámetro $i_{pa}/v^{1/2}$ versus v , siendo v la velocidad de barrido (figura 10) se observa que se incrementa al aumentar v . Según los criterios de diagnóstico propuestos por Nicholson y Shain,^[74] esta respuesta junto a la inexistencia de E_{pc} puede ser vinculado a un proceso $CE_{irreversible}$, es decir, una reacción química seguida de una reacción electroquímica.

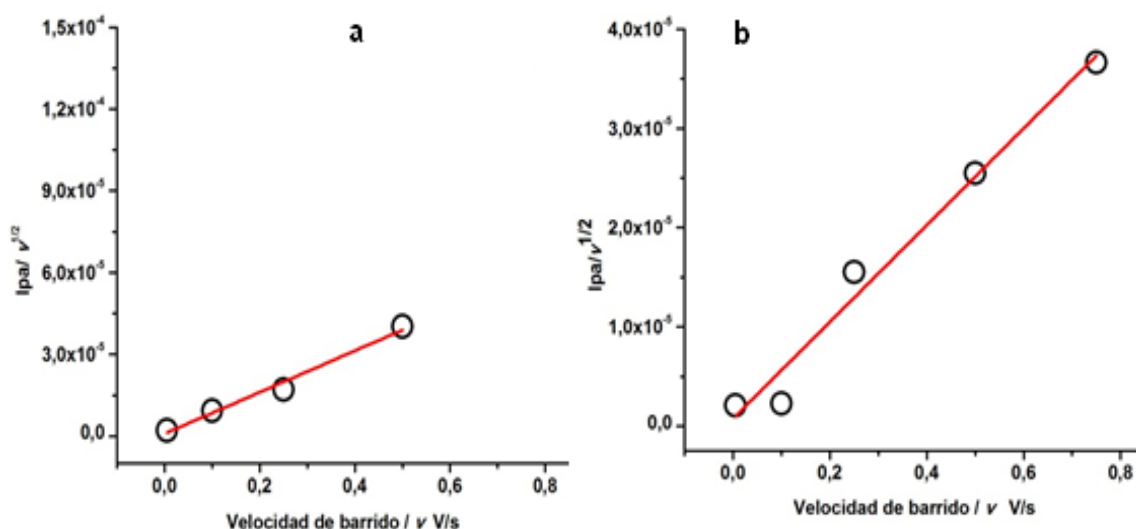


Figura 10. Relación lineal entre el cociente de i_{pa} y $v^{1/2}$ versus velocidad de barrido (v) V/s. Derivado 1 (a) 3 (b)

En comparación al resto de los compuestos, los derivados 6 y 7 presentaron un comportamiento electroquímico diferente. La figura 11a muestra

el voltamograma para el derivado **6**, en el cual se observa un segundo pico a potencial más positivo ($E_{pa2}=0,76$ V), este puede ser relacionado con la oxidación del segundo grupo hidroxilo que se encuentra más cercano al sustituyente trifluorometilo, grupo electroatractor fuerte que desplaza la densidad electrónica hacia el anillo α -pirona, afectando el proceso oxidativo. Recientemente, Petrucci y colaboradores^[75] observaron similar respuesta voltamperométrica para derivados de 7,8-dihidroxicumarina.

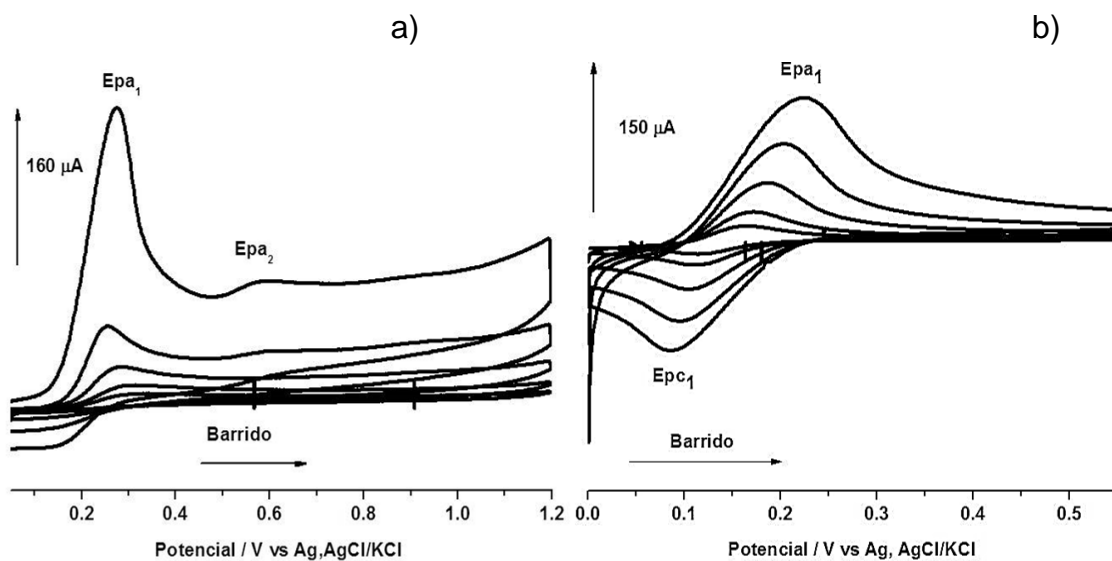


Figura 11. Voltamograma cíclico para el compuesto 6 (a) y compuesto 7 dihidroxilados (b).

El derivado 7 presenta una cupla cuasi-reversible con $E_{1/2}=0,16$ V (Figura 11b). Aplicando criterios de diagnóstico para una cupla cuasireversible se obtienen los gráficos de cociente de I_{pa} sobre $v^{1/2}$ y razón de corrientes *versus* velocidad de barrido mostrados en la figura 12a y 12b, respectivamente.

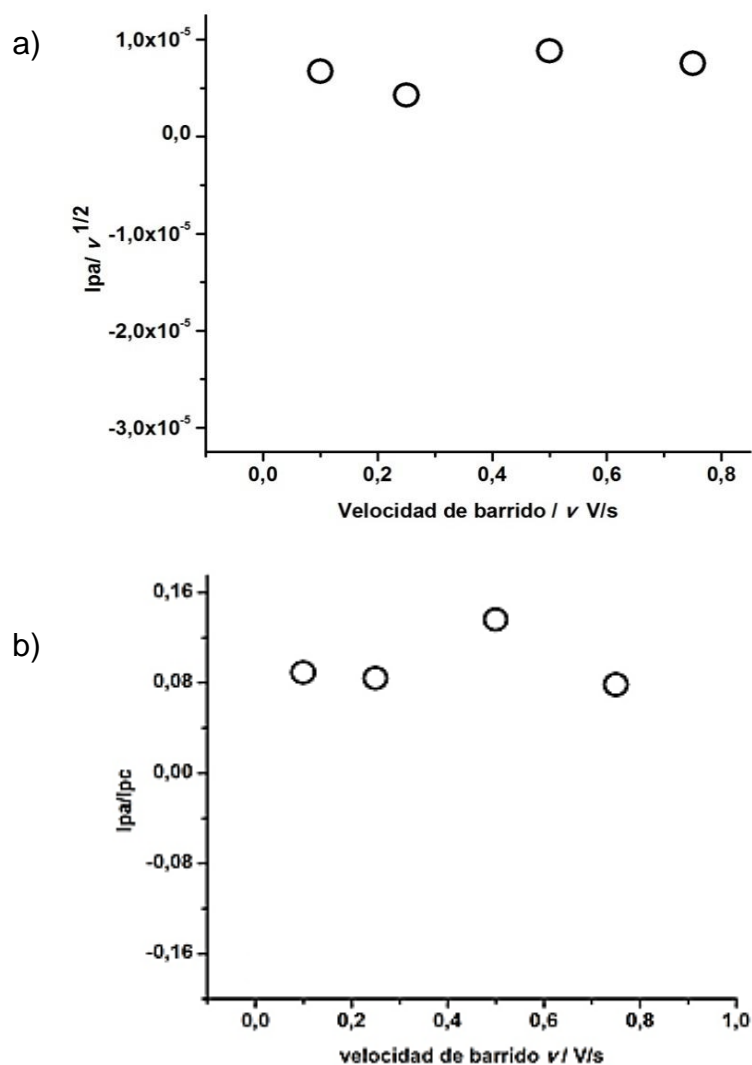


Figura 12. Parámetros I_{pa}/I_{pc} (a) y $I_{pa}/v^{1/2}$ (b) *versus* velocidad de barrido (v)

Estos gráficos muestran la independencia de estos parámetros con la velocidad de barrido. Junto a estos datos, el potencial de pico catódico se desplaza hacia valores negativos. Por tanto, **7** presentaría un mecanismo electroquímico seguido de una reacción química reversible de orden 1 (debido a la independencia de los valores de I_{pa}/I_{pc}) en estos casos la reversibilidad depende de la constante de equilibrio de la reacción química.

Asimismo, la diferencia en la respuesta voltamperométrica entre **6** y **7** estaría relacionada con el efecto electroattractor fuerte del grupo trifluorometilo en **6** en comparación con el endociclohexano en **7** que no afecta la densidad electrónica.

A través de los datos de las corrientes de pico anódicas a diferentes velocidades de barrido se generó el gráfico de corriente de pico anódica (I_{pa}) *versus* velocidad de barrido (v). Este análisis permitió demostrar que el proceso de oxidación de todos los derivados en estudio está controlado difusivamente, es decir la especie electroactiva se transporta a la superficie del electrodo a través de un proceso difusivo (figura 13).

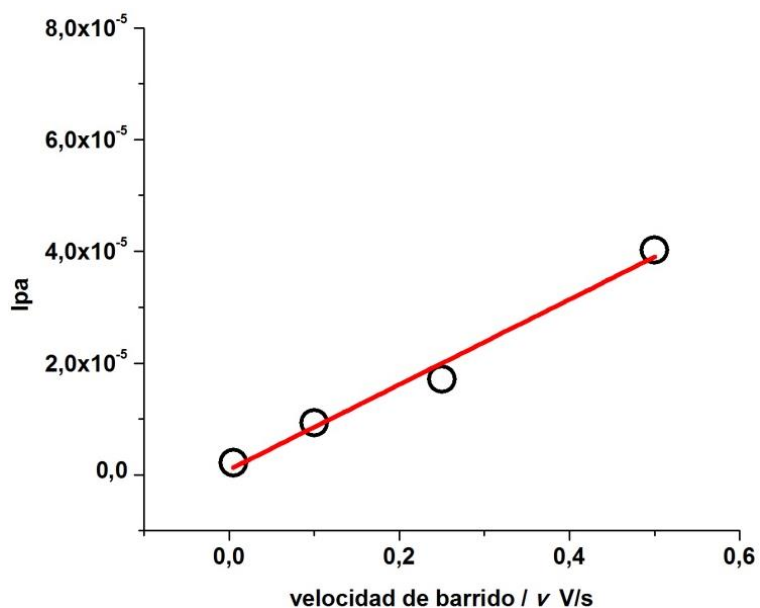


Figura 13. Gráfico corriente de pico anódico *versus* velocidad de barrido.

Desde el punto de vista de los potenciales de oxidación (tabla 1) los derivados monohidroxilados presentaron potenciales alrededor de 0,7 Volts. El compuesto **2** es el derivado que posee el menor potencial de pico anódico ($E_{pa}=0,65$ V) en comparación con el compuesto **1** ($E_{pa}= 0,74$ V) y el compuesto **4** ($E_{pa}= 0,75$ V) que prácticamente son iguales.

Al comparar los potenciales de los derivados **4** y **5**, la sustitución en posición *meta* en este último derivado no aporta densidad electrónica, por tanto no es un factor estructural que influya en la capacidad de ceder electrones.

Al contrario, los potenciales de oxidación de los derivados dihidroxilados **3**, **6** y **7** son menores a los obtenidos para el grupo monohidroxilado con valores $E_{pa}=0,33$ V, $E_{pa}=0,26$ V y $E_{pa}=0,22$ V, respectivamente. Este comportamiento

se debe a la formación de una orto-quinona como producto final. En estos casos la sustitución en posición *orto* es un factor estructural que aporta densidad electrónica favoreciendo el proceso oxidativo, desplazando los potenciales de oxidación hacia valores menos positivos.

La tabla 1 resume los potenciales de oxidación para todos los derivados en estudio, obtenidos del análisis de los voltamogramas a $0,75 \text{ v}\cdot\text{s}^{-1}$.

Derivado	Epa (Volts) versus electrodo Ag, AgCl (KCl, 3M)	Epc (Volts) versus electrodo Ag, AgCl (KCl, 3M)
1	0,74	-
2	0,65	-
3	0,33	-
4	0,75	-
5	0,68	-
6	0,26 / Epa ₂ = 0,76 V	-
7	0,22	0,09

Tabla 1. Potenciales de oxidación y reducción *versus* electrodo de referencia Ag, AgCl/ KCl obtenidos para los compuestos en estudio.

Caracterización de las especies radicalarias a través de Espectroscopia de Resonancia de Espín Electrónico

La Resonancia de espín electrónico (REE) es la única técnica espectroscópica que permite detectar radicales libres. Por esta razón, la utilizamos para detectar y caracterizar los radicales provenientes de la oxidación de los derivados de hidroxycumarina.

Los espectros REE para los derivados monohidroxilados junto al derivado **5** no mostraron un patrón hiperfino, esto puede ser correlacionado con la corta vida media de los radicales libres formados. Es por esto que se utilizó la metodología de espín trapping usando el atrapador de espín α -fenil-N-terbutil-nitrona (figura 14). El atrapador de espín es un compuesto diamagnético que al interactuar con un radical libre forma un espín aducto paramagnético, aumentando el tiempo de vida media de un radical libre y de esta forma haciendo posible la detección, en este caso, de radicales centrados en oxígeno o carbono.

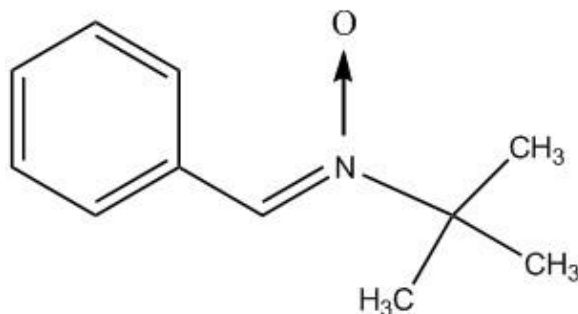


Figura 14. Estructura del atrapador de spín α -fenil-N-terbutil-nitrona (PBN).

En presencia de PBN se observó un espectro REE con un patrón de seis líneas (figura 15). Este patrón hiperfino puede ser explicado utilizando los valores de espín nuclear de hidrógeno y de nitrógeno presentes en PBN. Al contener núcleos distintos se utiliza la siguiente ecuación para predecir el número de líneas del patrón hiperfino del espectro REE.

$$\prod (2nI_j + 1) = N^\circ \text{ de líneas del patrón hiperfino} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde n corresponde al número de núcleos equivalentes e I corresponde al valor del espín nuclear.

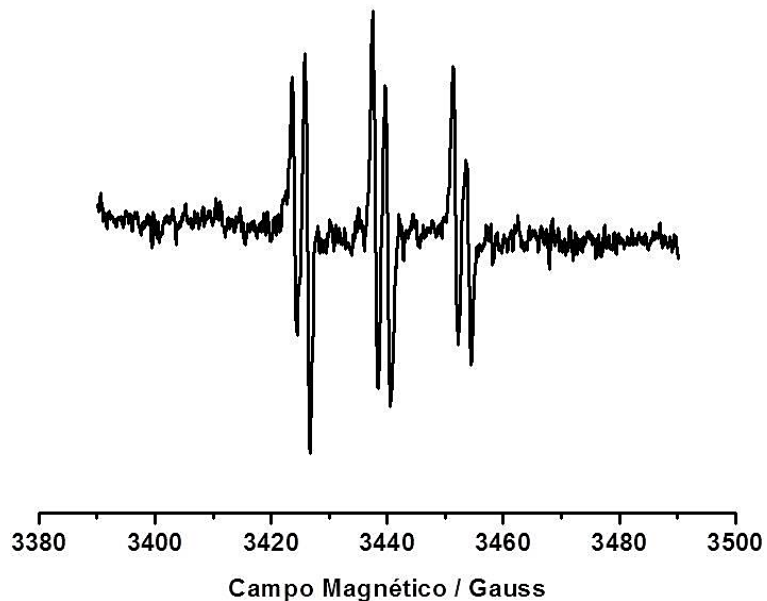


Figura 15. Espectro REE del espín aducto formado por el radical del derivado 1 en presencia del atrapador PBN.

De esta manera, el núcleo de hidrógeno ($I = 1/2$) aporta con tres líneas hiperfinas y el núcleo de nitrógeno ($I = 1$) aporta con dos, dando como producto las seis líneas características del atrapamiento de un radical centrado en carbono con constantes hiperfinas ($a_N \approx 13,5$; $a_H \approx 2,3$ G) para los derivados 1, 2, 4 y 5. Estos valores coinciden con los reportados en la literatura. ($a_N \approx 14,4$; $a_H \approx 3,3$ G).^[76]

Para estudiar la oxidación de los derivados **3**, **6** y **7**, cuyas estructuras presentan un grupo catecol, se llevó a cabo un pretratamiento de cada solución madre con cloruro de zinc (II).

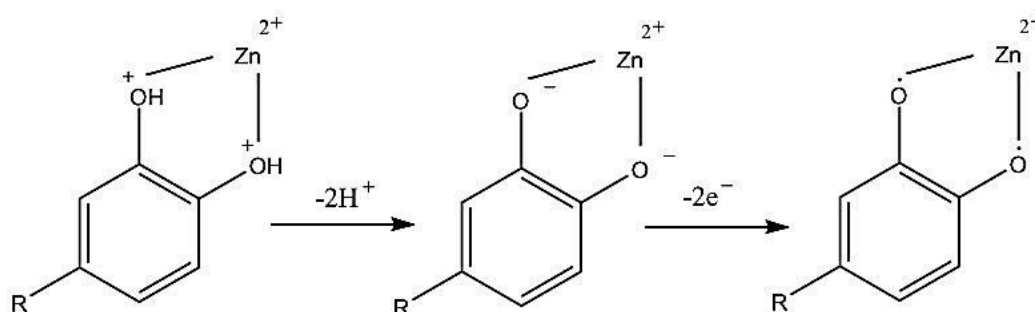


Figura 16. Proceso de formación de quelato en la oxidación de un grupo catecol.

El zinc posee espín nuclear $I = 0$ por tanto es silente a la técnica de REE y no modifica el patrón hiperfino de los espectros. Al interactuar el zinc con grupos catecol forma un quelato, tal como se muestra en la figura 16, aumentando la estabilidad del radical en ausencia de un atrapador de espín.

Este tipo de pretratamiento se ha utilizado en estudios de actividad antioxidante de compuestos presentes en el té.^[77]

La figura 17a muestra un espectro REE simétrico de nueve líneas obtenido para el compuesto **3**, el cual es interpretado en términos de la formación del radical semiquinónico cuya deslocalización es a través de todo el núcleo cumarínico.

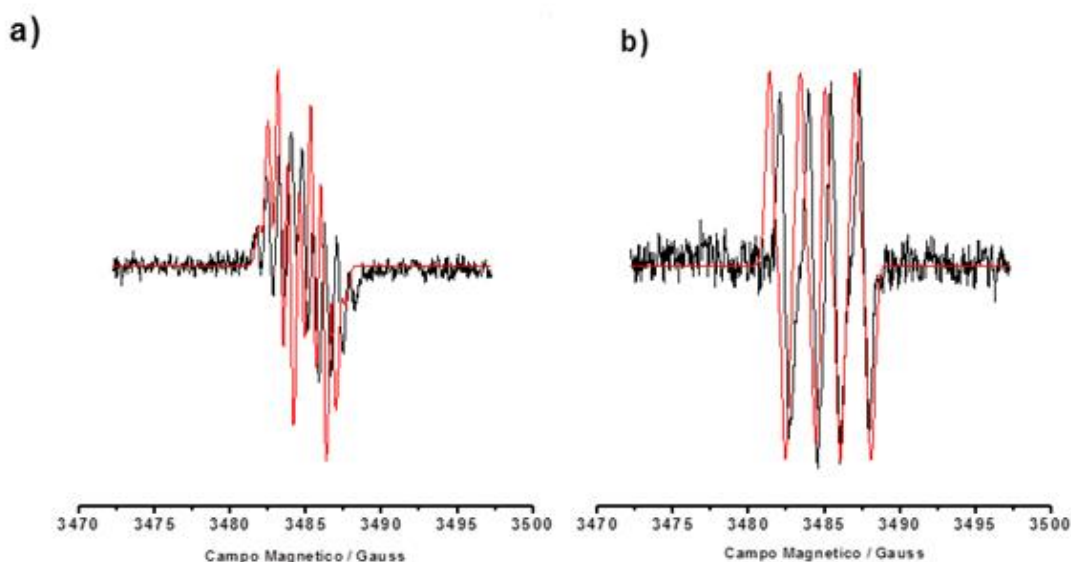


Figura 17. Espectros REE experimental en negro y simulado en rojo para el radical generado en los derivados (a) **3**; (b) **6** en presencia de ZnCl_2 . Los espectros simulados fueron obtenidos utilizando el software SimFonia versión 1.25

Los acoplamientos hiperfinos se producen entre los núcleos de hidrógeno en las posiciones 3, 5 y 8 con constantes hiperfinas $a_H = 0,65$ G, $a_H = 0,67$ G, y $a_H = 2,00$ G, así como una $a_H = 0,52$ G para tres núcleos de hidrógeno equivalentes del grupo metilo en posición 4. El espectro REE del compuesto **6** (figura 17b) muestra un patrón hiperfino de cuatro líneas, indicando un acoplamiento hiperfino de los núcleos de hidrógeno en posición 3,5 y 6 con $a_H = 1,87$ G, $a_H = 3,34$ G y $a_H = 0,49$ G del anillo cumarínico.

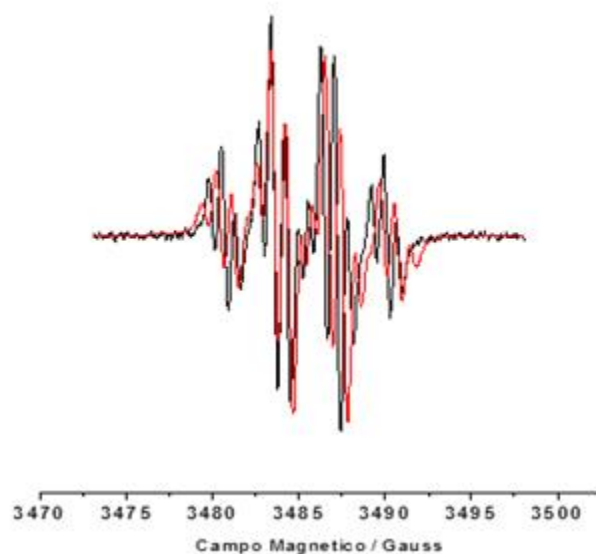


Figura 18. Espectros REE experimental en Negro y simulado en rojo para el radical generado en el derivado **7** en presencia de $ZnCl_2$. El espectro fue simulado utilizando el software SimFonia Versión 1.25

El espectro del derivado **7** que se muestra en la figura 18 posee un patrón hiperfino de doce líneas, asignado a la deslocalización del electrón a través del núcleo cumarínico así como el acoplamiento con tres núcleos de hidrógeno presentes en el endociclohexano en la posición 3 y 4 del esqueleto cumarínico (figura 2). Las constantes hiperfinas $a_H = 0,72$ G, $a_H = 0,78$ G fueron atribuidas a dos hidrógenos equivalentes y $a_H = 2,90$ G para tres núcleos equivalentes de hidrógeno.

De esta manera es posible comprobar que la oxidación de todos los derivados en estudio pasa por la formación un radical semiquinónico. La simulación de los espectros REE permitió correlacionar la distribución de densidad de espín con los valores experimentales de las constantes hiperfinas. Además, la utilización de atrapador de espín en los derivados monohidroxilados o la formación de quelatos en los derivados **3**, **6** y **7** es congruente con la inestabilidad del producto de oxidación observado mediante voltametría cíclica.

Evaluación de la capacidad antioxidante de derivados de hidroxycumarina mediante la metodología ORAC fluoresceína (ORAC-FI)

La caracterización electroquímica y la detección del radical libre formado en los compuestos en estudio por REE permiten establecer que los derivados con grupos catecol en su estructura tendrán la mayor capacidad antioxidante que los restantes de la serie. Para comprobar esto se evaluó la capacidad de *scavenging* o apagamiento de radicales peroxilo a través del método ORAC utilizando como sonda fluoresceína (FI).

Esta metodología da un índice relativo a una molécula estándar Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico) el cual es un derivado hidrosoluble de la vitamina E. (Figura 19)

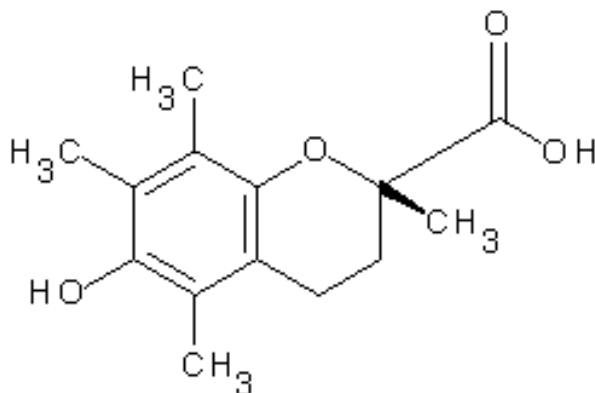


Figura 19. Estructura del compuesto estándar Trolox.

Los perfiles cinéticos de consumo de FI inducidos por radicales peroxilo fueron monitoreados a 528 nm en presencia y ausencia de diferentes concentraciones. Los perfiles cinéticos para los compuestos **1**, **2**, **4** y **5** se muestran en la figura 20.

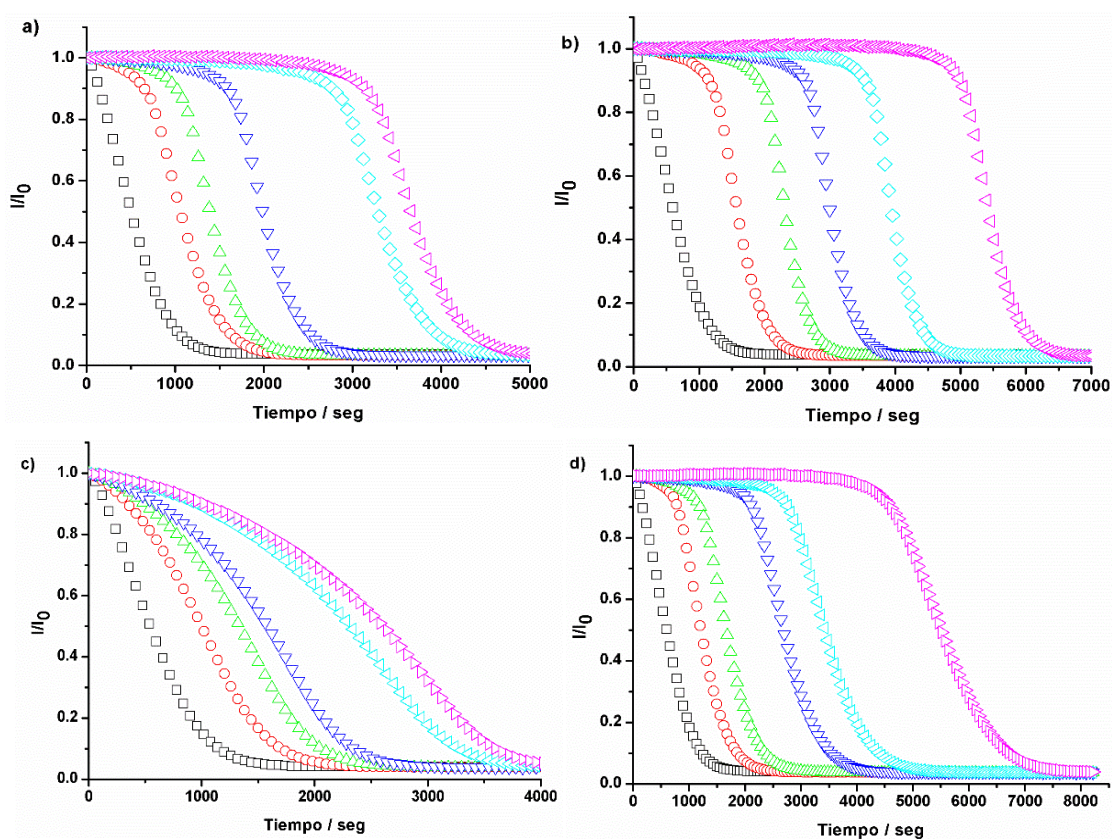


Figura 20. Perfiles cinéticos del consumo de FI inducido por $\text{ROO}\cdot$ en presencia del compuesto **1** (a); compuesto **2** (b); compuesto **4** (c) y compuesto **5** (d). Los colores indican diferentes concentraciones de derivados de hidroxycumarina. Negro: Control; rojo: $0,5 \mu\text{M}$; verde: $1 \mu\text{M}$; azul: $1,5 \mu\text{M}$; celeste: $2,0 \mu\text{M}$ y violeta: $2,5 \mu\text{M}$.

Todos los perfiles presentaron tiempos de inducción bien definidos. Este parámetro se define como el tiempo durante el cual la sonda, en este caso fluoresceína, es protegida completamente por la molécula antioxidante de la oxidación mediada por ROO• al adicionar al sistema la molécula antioxidante.

La efectividad del antioxidante es evaluada a partir del área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia neta *versus* tiempo, este valor es graficado en función de la concentración del antioxidante y mediante la linealización de los datos (figura 21) y el uso de la ecuación 4 se obtienen los valores de índice ORAC relativo a la molécula estándar, Trolox.

$$\text{Índice ORAC}_{\text{relativo a Trolox}} = \left[\frac{(AUC_{AH} - AUC_{Blanco})}{(AUC_{Trolox} - AUC_{Blanco})} \right] * \frac{[Trolox]}{[AH]} \quad \text{Ecuación 2}$$

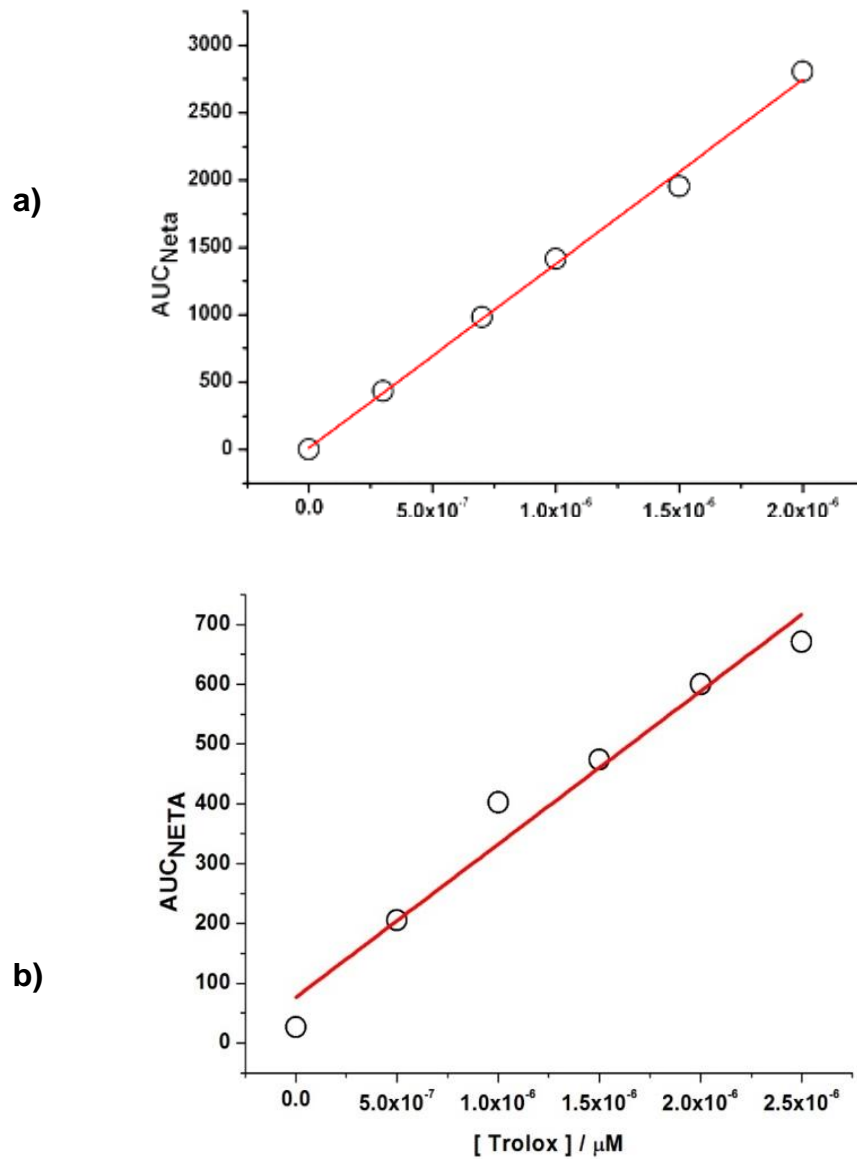


Figura 21. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) vs concentración de hidroxycumarina 1 (a); Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) vs concentración de Trolox (b). $R^2 = 0,9960$ y $R^2 = 0,9553$

Los valores de índice ORAC obtenidos para todos los derivados son tabulados en la tabla 2.

Derivado	Índice ORAC-FI
1	5,9 ± 0,5
2	9,4 ± 0,3
3	3,6 ± 0,3
4	3,5 ± 0,2
5	3,3 ± 0,1
6	1,9 ± 0,1
7	2,4 ± 0,2
Trolox	1,0

Tabla 2. Valores Índices ORAC-FI obtenidos para los derivados en estudio. (n=3)

Todos los derivados evaluados presentaron mayor capacidad antioxidante que el estándar Trolox.

Los derivados **1** y **2** (ORAC= 5,9 ± 0,5 y 9,4 ± 0,3) poseen los mayores valores de índice ORAC. A pesar de tener sólo un grupo hidroxilo, estos valores

son comparables con los índices de Quercetina ($7,3 \pm 0,2$) y Catequina ($6,8 \pm 0,2$).^[78]

Contrariamente, los derivados con grupo catecol evidenciaron índices ORAC alrededor de 3, siendo el derivado **6** el de menor capacidad antioxidante ($1,9 \pm 0,1$). En orden decreciente la habilidad de *scavenging* frente a radicales peroxilo fue:

$$2 > 1 > 3 > 4 > 5 > 7 > 6$$

Se ha establecido que moléculas que poseen un bajo valor de potencial de oxidación tienen una mayor capacidad antioxidante. De acuerdo a esto se establecería que los compuestos con grupo catecol presentan mejores propiedades antioxidantes que los otros derivados monohidroxilados.^[71, 79-81] Por ello, los resultados de los estudios electroquímicos y por resonancia de espín electrónico nos condujeron a proponer, al igual que otros autores, que los derivados dihidroxilados tendrían mejor capacidad antioxidante que los derivados monohidroxilados. Sin embargo, esta conclusión no estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos por el ensayo ORAC-FI.

El siguiente esquema de reacciones ha sido definido para el ensayo ORAC usando como sonda fluoresceína. Definiendo a FOH como fluoresceína en su forma reducida (figura 22), ArOH como cualquier molécula antioxidante y ROO• como radicales peroxilo provenientes de la termólisis de AAPH a 37° C.

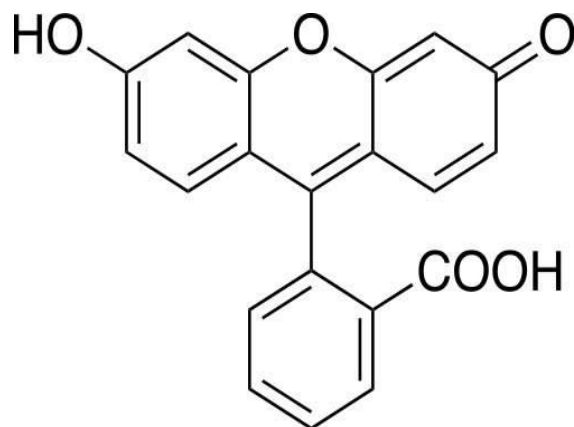
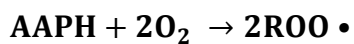
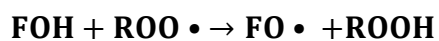


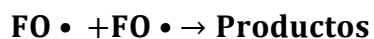
Figura 22. Molécula sonda fluoresceína



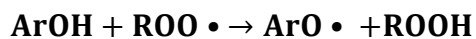
Reacción 3



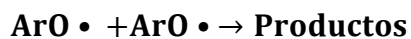
Reacción 4



Reacción 5



Reacción 6



Reacción 7

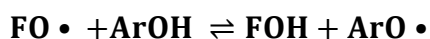


Reacción 8

Este diagrama de reacciones es descrito como: La descomposición de AAPH sigue un mecanismo de primer orden (reacción 3). No obstante, a altas concentraciones (18 mM) la velocidad de generación de radicales peroxilo, para estas condiciones experimentales, es 1,47 $\mu\text{M}/\text{min}$. Por tanto, el cambio en la concentración de $\text{ROO}\cdot$ en el tiempo es pequeño, es por esto que se puede

utilizar la aproximación de estado estacionario $[ROO\bullet]_{ss}$. Entonces la ley de velocidad para la reacción de hidroxycumarina con radicales peroxilo es de pseudo primer orden (reacción 6). La reacción 4 indica la oxidación de la sonda fluoresceína (FOH) en presencia de radicales peroxilo. Las reacciones 5, 7 y 8 representan el decaimiento de las especies radicalarias a través de procesos de dimerización o disproporción.

Las diferencias en los perfiles cinéticos para antioxidantes con diferentes potenciales de oxidación han sido explicadas a través de las reacciones entre radicales peroxilo ($ROO\bullet$) con fluoresceína (FOH) y la molécula antioxidante ($ArOH$).^[82] En este contexto, considerando las reacciones antes expuestas, Bisby y colaboradores^[82] sugirieron una reacción adicional al esquema de reacciones, en el cual definieron la reacción del radical fluoresceil con la molécula antioxidante (reacción 9). Relacionando la forma de la curva de decaimiento de fluorescencia con la magnitud de la constante de equilibrio de la reacción 9.



Reacción 9

La constante de equilibrio K para esta reacción es:

$$K = \frac{[FH][ArO\bullet]}{[FO\bullet][ArOH]}$$

Esta constante de equilibrio es dependiente de la diferencia en los potenciales de oxidación (E'_0) entre $FO\bullet$ y $ArO\bullet$ a través de la relación:

$$\Delta E'_0 = \frac{RT}{nF} \ln K$$

La presencia de la reacción 9 sugiere que la forma de las curvas depende del potencial redox del antioxidante. Por consiguiente un antioxidante con un menor $E'_0(ArO\bullet, H^+/ArOH)$ produce un desplazamiento del equilibrio hacia la derecha produciendo un tiempo de inducción bien definido influyendo en los valores de índice ORAC.

Al graficar los valores de sus índices ORAC *versus* potenciales de oxidación de la serie de grupos monohidroxilados y dihidroxilados (figura 23a y 23b). Es posible establecer visualmente una correlación en los derivados monohidroxilados. Sin embargo, al comparar los valores de potencial de oxidación entre los derivados **1** y **4** son prácticamente iguales, al contrario de sus valores de índice ORAC en donde **1** posee el doble de capacidad antioxidante que el derivado **4** (tabla 2). Por otra parte los valores de índice ORAC para los derivados dihidroxilados no correlacionan con los valores de potencial de pico anódico.

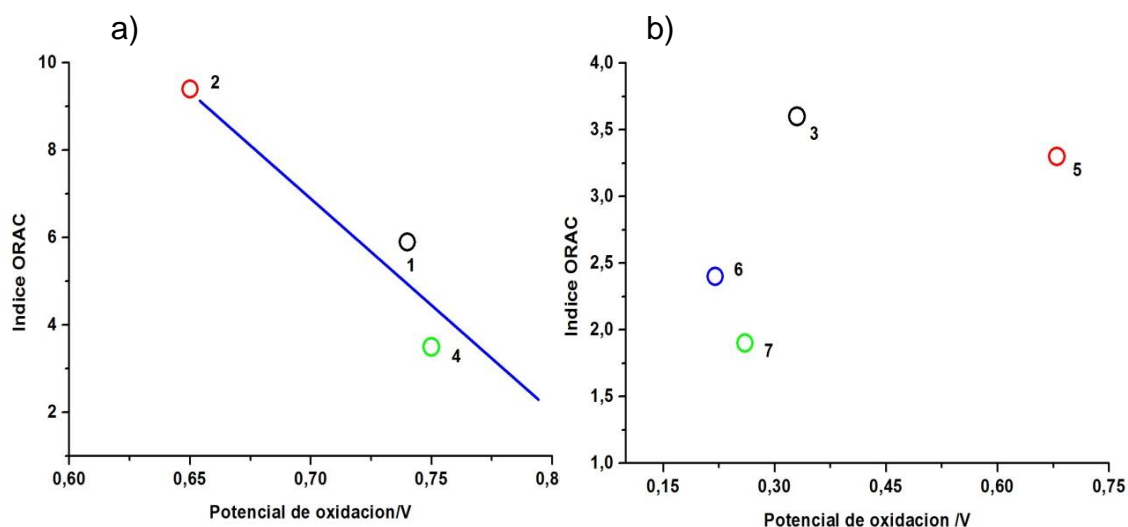


Figura 23. Dependencia del valor de índice ORAC-FI para los derivados de monohidroxycumarina (a) y dihidroxycumarina (b) *versus* potencial de oxidación, sobre cada punto se señala el derivado.

Por consiguiente, a pesar de ser un parámetro que ha sido relacionado con la actividad antioxidante, el potencial de oxidación nos da cuenta de la energía necesaria para que un compuesto ceda electrones, es decir, un factor termodinámico. Por tanto, es necesario tomar en cuenta el aporte del factor cinético en la evaluación de la capacidad antioxidante. De esta manera, los valores obtenidos para el índice ORAC también son dependientes del mecanismo de reacción y de la constante de velocidad.

Etsuo Niki postuló que la forma de decaimiento de la curva y los valores de AUC también dependen de la molécula sonda, es por esto que perfiles con mayores tiempos de inducción están relacionados con una baja reactividad de

la molécula sonda en su reacción con radicales libres. Incluso, el valor del área bajo la curva (AUC) toma en cuenta el tiempo de inducción, la velocidad inicial y la extensión de la inhibición total en un solo valor.^[83]

Estos factores podrían explicar la ausencia de correlación entre los valores de índice ORAC *versus* potencial de oxidación de los derivados de cumarina.

Es posible analizar el efecto de los sustituyentes ya sea electroattractores y electrodonores presentes en el núcleo cumarínico. Para esto, se separó esta serie de compuestos en dos categorías: primero, el grupo de los derivados monohidroxilados y segundo, el grupo de los derivados dihidroxilados.

Un factor estructural presente en todos los derivados en estudio, fue el grupo 1,2-pirona ubicado en el anillo B. Este posee propiedades electroattractoras,^[84] desfavoreciendo el proceso oxidativo en todos los compuestos.

Al hacer el análisis de los sustituyentes presentes en los derivados monohidroxilados, los compuestos **1** y **2** poseen un grupo metoxilo en posición *meta* respecto al grupo hidroxilo. De acuerdo a las reglas de Hammett este sustituyente ejerce un efecto electroattractor de electrones en esa posición,^[84] por tanto, desfavorecen el proceso de oxidación y se ve reflejado en los altos valores de potencial de oxidación.^[85]

En el compuesto **5** se manifiesta el mismo comportamiento del segundo sustituyente hidroxilo en posición *meta*, ejerciendo propiedades electroattractoras, de esta manera afectando el proceso de transferencia de un átomo de hidrógeno.^[86]

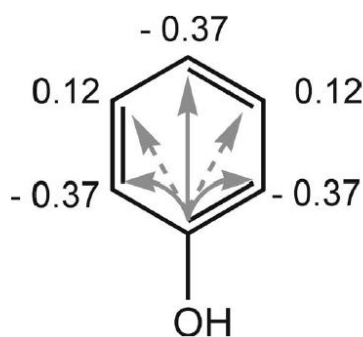


Figura 24. Valores sigma Hammet (σ) de un grupo hidroxilo aromático. Un sustituyente hidroxilo en un anillo aromático tiene un efecto electroattractor en posición *meta* ($\sigma=+0,12$) y un efecto electrodonor en la posición *orto* y *para* ($\sigma=-0,37$)

El efecto electrodonador de resonancia del grupo hidroxilo en posición *orto* (catecol) en los compuestos **3**, **6** y **7** favorece la transferencia de un átomo de hidrógeno. Sin embargo, dependiendo de la ubicación en el anillo es posible la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo en posición 8 con el oxígeno del anillo α -pirona (en el caso de **6** y **7**) afectando la capacidad de ceder el átomo de hidrógeno afectando su capacidad antioxidante reflejada en los valores de índice ORAC. La comparación de estos tres derivados permite

concluir que la sustitución en posición 8 disminuye la capacidad antioxidante en estos derivados.

Finalmente, el grupo trifluorometilo en posición 4 del anillo cumarínico del compuesto **6**, al ser un grupo altamente electroatractor ejerce una fuerte disminución en la capacidad dadora de átomo de hidrógeno influyendo negativamente en su capacidad antioxidante evaluada mediante el ensayo ORAC-FI.

Otra forma de dar explicación a los valores de índice ORAC es a través de la utilización de patrones de derivados de hidroxycumarina. La figura 26 muestra el perfil cinético obtenido en ensayo ORAC-FI para el derivado 7-hidroxycumarina (figura 25) utilizado como molécula patrón para este grupo de compuestos en estudio.

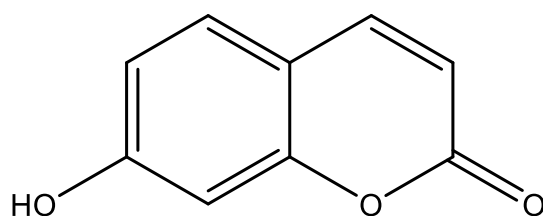


Figura 25. Estructura química del derivado 7-hidroxycumarina.

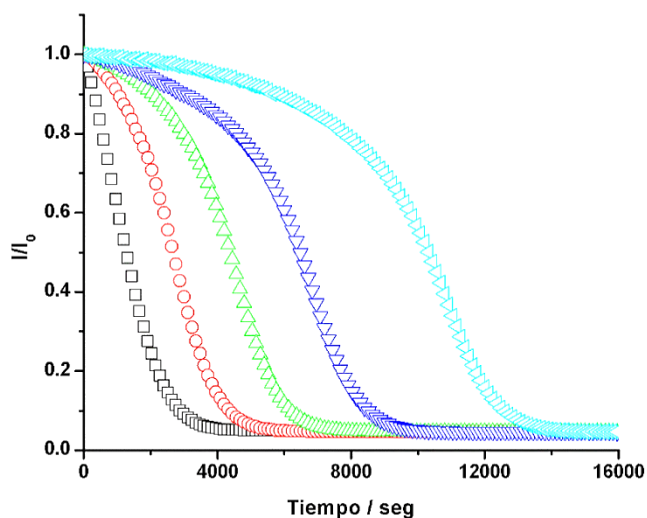


Figura 26. Perfiles cinéticos del consumo de FI inducido por ROO• en presencia del derivado 7-hidroxicumarina. Negro: Control; rojo: 0,5 μM ; verde: 1 μM ; azul: 1,5 μM ; celeste: 2,0 μM .

A través de la integración del área bajo la curva del perfil de la figura 26 y mediante la ecuación 2 se determinó un valor de índice ORAC de 9,7 para este derivado. Este valor es prácticamente el mismo que el determinado para el compuesto **2**. De acuerdo a esto, se comprueba que el efecto electrónico ejercido por el grupo metoxilo en posición *meta* no influye en la capacidad antioxidante del derivado **2**.

Además, es posible que la presencia de orbitales p libres en este sustituyente en derivado **2** permita una mayor estabilización del radical semiquinónico. El valor del potencial de oxidación reportado para el derivado 7-hidroxicumarina en iguales condiciones experimentales es 0,66 V.^[86] Al

comparar el valor de E_{pa} de este estándar con el determinado para el compuesto **4** ($E_{pa} = 0,75$ V) se evidencia el efecto inductivo electroattractor que ejercería el sustituyente clorometilo en posición 4 desfavoreciendo el proceso de oxidación.

Por tanto, al igual que los estudios anteriores, estos resultados no fueron concordantes con los parámetros: índice ORAC, potencial de oxidación y número de grupos hidroxilo.

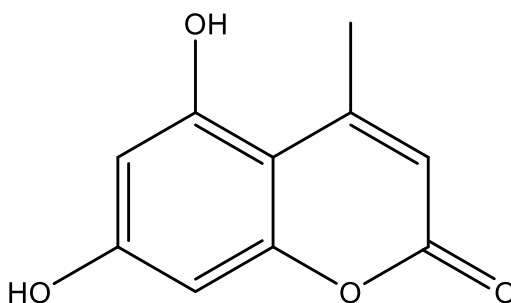


Figura 27. Estructura del derivado 4-metil-5,7-dihidroxicumarina.

Al comparar el valor de índice ORAC (2,8) determinado para el derivado 5,7-dihidroxi-4-metil-cumarina (figura 27) con el valor obtenido para el compuesto **4** y **5**, se comprueba el efecto electroattractor del grupo hidroxilo en posición *meta*. La figura 28 y 29 muestran el perfil cinético y la dependencia del AUC_{Neta} *versus* concentración para el derivado 5,7-dihidroxi-4-metil-cumarina, respectivamente.

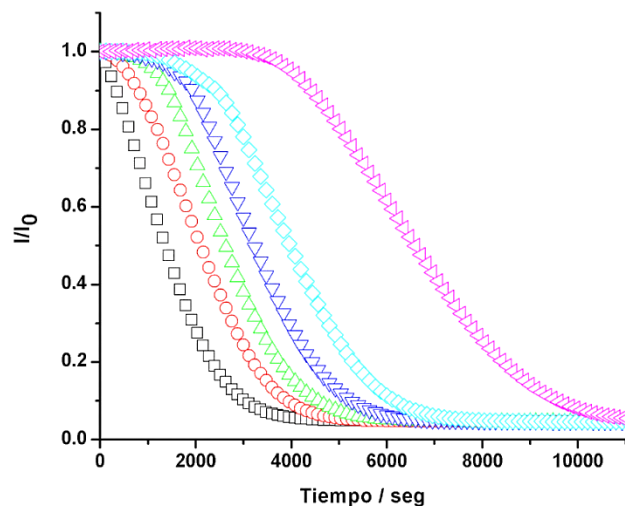


Figura 28. Perfiles cinéticos del consumo de FI inducido por ROO• en presencia del derivado 5,7-dihidroxi-4-metil-cumarina.

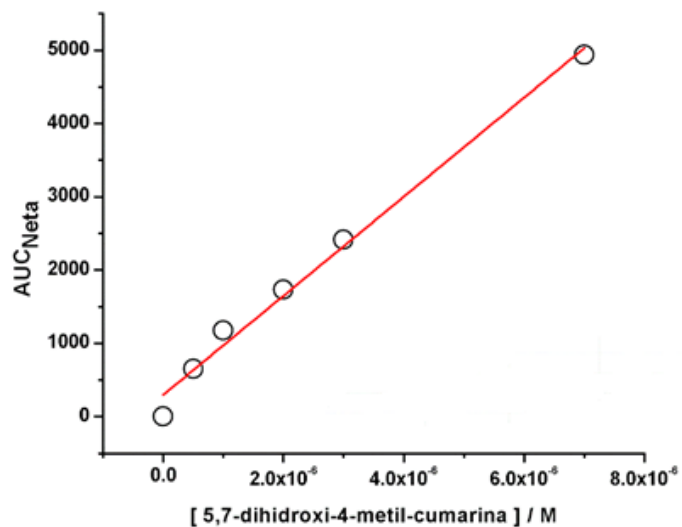


Figura 29. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) vs concentración de 5,7-dihidroxi-4-metil-cumarina. $R^2=0.98738$

Los resultados de capacidad antioxidante presentados anteriormente no han sido explicados desde el análisis estructural y termodinámico. Por tanto se

realizaron experimentos con el objetivo de profundizar en las variables que podrían estar implicadas en el comportamiento obtenido.

Estudio de perfiles cinéticos en el ensayo ORAC-FI

En el ensayo ORAC la pérdida de fluorescencia de la molécula sonda generalmente muestra un tiempo de inducción en presencia de antioxidantes (ArOH). Definido como el tiempo en el cual la sonda está siendo protegida por la adición de ArOH de su oxidación inducida por radicales peroxilo.^[78]

Como se muestra en la figura 20 a, b y d, todos los compuestos generaron perfiles con tiempos de inducción bien definidos y crecientes en función de la concentración de ArOH, con excepción del compuesto **4** cuyo tiempo de inducción fue menor y duró hasta aproximadamente los 250 segundos de reacción para la mayor concentración estudiada(figura 20c).

El tiempo de inducción es determinado por la cantidad de radicales que reaccionan con la molécula antioxidante, de esta manera se relaciona con la concentración de antioxidante, la estequiometría de la reacción y con la velocidad de generación de radicales peroxilo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{n[ArOH]}{R_i}$$

Ecuación 3

Donde:

τ = Tiempo de inducción.

n= Estequiometría de la reacción, corresponde a las moléculas de ROO• apagados por cada molécula de antioxidante.

[ArOH]= Concentración de antioxidante.

R_i = Velocidad de generación de radicales peroxilo.

La velocidad de generación de radicales peroxilo es dependiente de la concentración del azocompuesto (AAPH) y fue calculada según la siguiente ecuación:^[83]

$$R_i = 1,36 \times 10^{-6} [AAPH]$$

Ecuación 4

Dando un valor de $R_i = 1,47 \mu\text{M}/\text{min}$ para nuestras condiciones de trabajo (AAPH= 18 mM, 37°C)

Si utilizamos la ecuación 4 para el análisis de los derivados de hidroxycumarina se obtienen valores de estequiometría detallados en la tabla 3. Por ejemplo, el valor de n para el derivado **2** fue 49 a una concentración de 2 μM , es decir, se *apagarían* 49 moléculas de ROO• por molécula de este

compuesto. Estos valores difieren con la estequiometría determinada para Trolox, vitamina E y algunos fenoles cuyo valor es de 2.^[87, 88] Además, no son valores explicables desde el punto de vista teórico y experimental. El derivado **4** es el único de esta serie cuya estequiometría fue de un orden de magnitud con un valor de 3.

Derivado	Estequiometría
1	48
2	49
3	10
4	3
5	14
6	6
7	9

Tabla 3. Valores de estequiometría de reacción determinada a través de la ecuación 4 a la máxima concentración del ensayo ORAC-FI para cada derivado. (n=3)

Estos valores estequiométricos podrían dar cuenta de la existencia de otros mecanismos asociados, *vide infra*.

Estudio de la influencia en los valores de índices ORAC de los derivados en estudio al cambiar la molécula sonda

Hasta este momento se ha realizado un análisis de varios parámetros que podrían dar explicación a los perfiles e índices ORAC obtenidos.

A pesar de esto, los valores de potenciales de oxidación, el análisis de sustituyentes y la estequiometría de reacción no han coincidido con el comportamiento de los antioxidantes ni han permitido explicar por completo estos resultados.

Al respecto, la literatura indica que la elección de la molécula sonda para el ensayo ORAC promueve la presencia o ausencia de tiempos de inducción y modifica los valores de índices ORAC obtenidos. Incluso, llevando en algunos casos a la proposición de conclusiones opuestas.^[89-91]

Considerando estos antecedentes se evaluó el efecto del uso de dos sondas diferentes sobre el perfil cinético y el índice ORAC de dos compuestos de la serie (figura 30): uno monohidroxilado (**1**) y el otro con un grupo catecol (**3**) cuyos valores ORAC-FI fueron 5,9 y 3,6, respectivamente. Las sondas seleccionadas fueron: Piranina y Rojo de pirogalol.

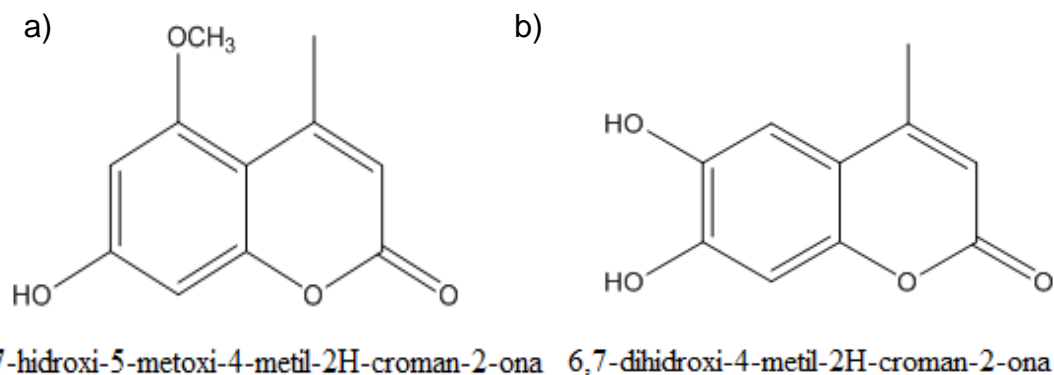


Figura 30. Estructuras derivados **1** (a) y **3** (b).

El uso del compuesto ácido-8-hidroxipiren-1,3,6-trisulfónico (piranina, Py) como sonda fluorescente fue estudiada por Pino y colaboradores,^[92] cuyos resultados permitieron proponer una cinética de reacción con AAPH de orden cero en piranina, incluso a concentraciones menores a 0,25 μM , determinando una velocidad de consumo promedio de Py de 0,35 $\mu\text{M}/\text{min}$. Además, se determinaron los perfiles cinéticos (ORAC-Py) con tiempos de inducción bien definidos, siendo el valor del índice ORAC dependiente de procesos de reparación de radicales piranil por parte de la molécula antioxidante^[92]

En el segundo ensayo se utiliza la sonda rojo de Pirogalol (ORAC-PGR) cuya alta reactividad en la reacción con $\text{ROO}\cdot$ relaciona este método con la constante de velocidad de la molécula antioxidante frente a estos radicales.^[93]

Ensayo ORAC-Py

El compuesto **1**, estudiado bajo las mismas condiciones experimentales que los ensayos ORAC-FI no protegió la sonda piranina. A pesar de esto, al aumentar la concentración del derivado se obtuvo un perfil cinético caracterizado por la ausencia de tiempo de inducción (figura 31,32).

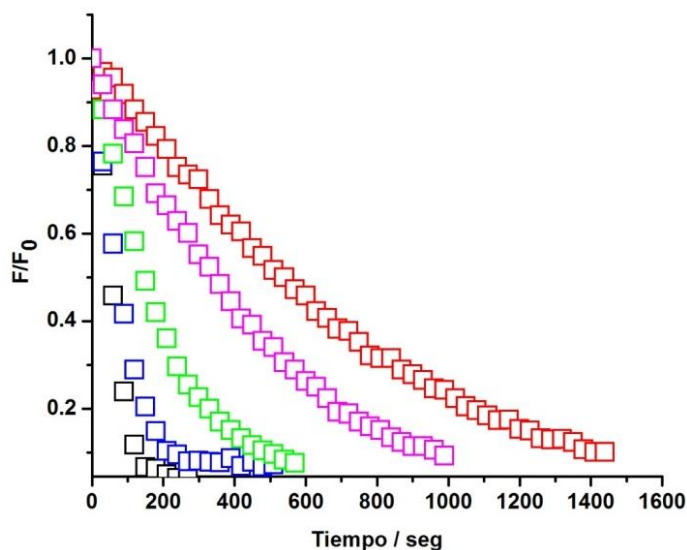


Figura 31. Perfil cinético del consumo de Py inducido por ROO• en presencia del derivado **1**. Negro: Control; azul: 2 μM ; verde: 4 μM ; violeta: 7 μM ; rojo: 10 μM .

Este tipo de perfil cinético, de tipo competitivo en ausencia de tiempo de inducción, daría cuenta de una baja reactividad del compuesto **1** por los radicales en comparación con la sonda Py. Además, se descarta el reparo del radical piranil por parte del derivado **1**.

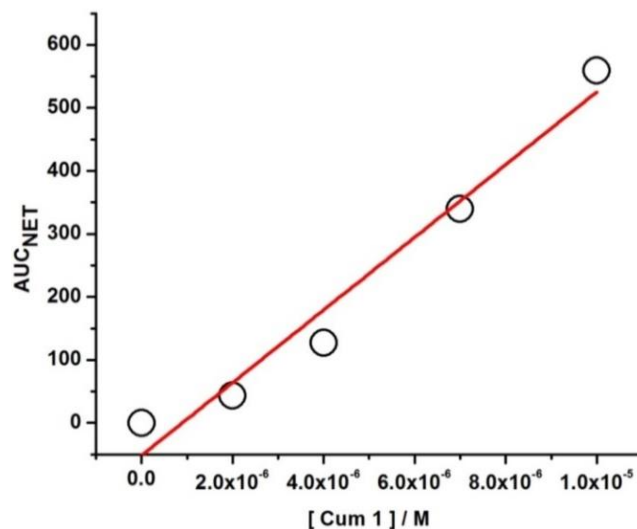


Figura 32. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) *versus* concentración de **1**. $R^2 = 0,9564$

Al contrario, el compuesto **3** presentó perfiles cinéticos con tiempos de inducción bien definidos indicando protección de la sonda Py. Además, se obtuvo una dependencia lineal entre AUC_{net} y las concentraciones de **3** como se muestra en la figura 33 y 34.

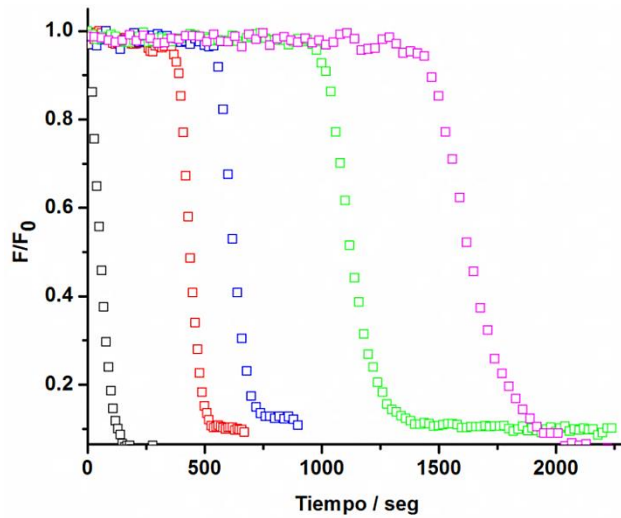


Figura 33. Perfil cinético del consumo de Py inducido por ROO• en presencia del derivado **3**. Concentraciones: negro: control; rojo: 0,5 μM ; azul 1 μM ; verde 2 μM ; violeta 3 μM .

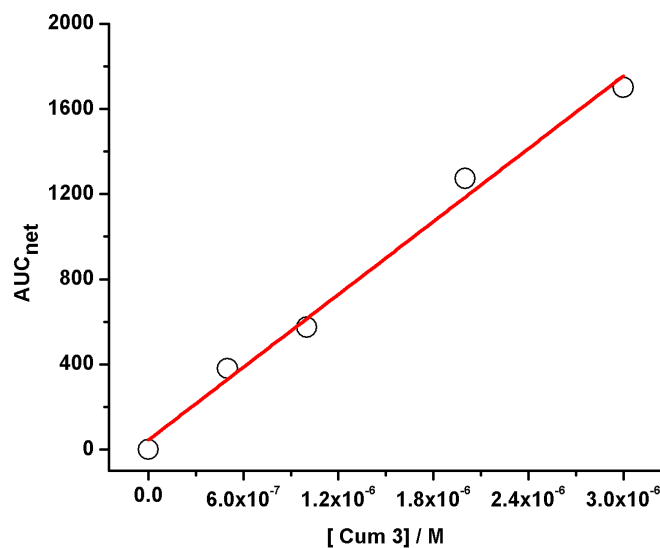


Figura 34. Dependencia del área bajo la curva neta (AUC_{Neta}) *versus* concentración de **3**. $R^2=0,9882$

Del perfil cinético del compuesto **3** se determinó el valor del tiempo de inducción a la mayor concentración de este derivado (7 μM) obteniéndose un valor de estequiometría de $5,95 \approx 6$. Si bien la presencia de tiempo de inducción daría cuenta de un mecanismo de reparo de $\text{Py}\cdot$ se obtendría una estequiometría de 4 radicales peroxilo, dos por parte de la sonda Py y dos por parte del compuesto **3**. Es decir, la estequiometría de reacción entre este derivado y radicales peroxilo sigue siendo igual al reportado en la literatura $n=2$.^[87, 88] Por tanto, este ensayo nos permite establecer que el compuesto **3** según este ensayo sería más reactivo que **1** en la reacción frente a $\text{ROO}\cdot$ en presencia de la molécula sonda.

Para ambos derivados (**1** y **3**) se determinó un índice ORAC-Py resultando 0,1 y 1, respectivamente (tabla 4).

Para la evaluación de protección de la sonda PGR por parte de **1** o **3** se evidenció la nula protección de esta sonda por parte de la adición de los compuestos, incluso se llegaron a utilizar altas concentraciones en celda (hasta 2,2 mM). Esto puede ser explicado debido a la alta reactividad de PGR frente a radicales peroxilo en comparación a los derivados adicionados al sistema.

Los perfiles cinéticos obtenidos para los distintos experimentos ORAC utilizando fluoresceína, piranina y rojo de pirogalol, permiten concluir que existirían procesos secundarios que son relevantes tanto en ORAC-FI como en ORAC-Py.

Derivado	ORAC-FI	ORAC-PY	ORAC-PGR
1	5,9	0,1	-
3	3,6	1	-
Trolox	1	1	1

Tabla 4. Índices ORAC para los compuestos **1** y **3** utilizando las sondas FI, Py y PGR.

Por tanto, se deben tomar en cuenta otros procesos asociados a la reacción de **1** o **3** en los diferentes ensayos ORAC.

Estudio de la cinética de reacción directa de radicales peroxilo con hidroxycumarinas

Dado que el valor del área bajo la curva (AUC) toma en cuenta el tiempo de inducción que como vimos, en algunas situaciones, es dependiente de procesos de reparo (reacción 9), de la velocidad inicial de reacción entre la molécula antioxidante con los radicales peroxilo y la extensión de la inhibición total.^[83] Se hace necesario modificar el sistema e independizar el ensayo de la molécula sonda.

Por esto se estudió la reacción directa de los derivados en estudio con radicales peroxilo generados a partir de la pirólisis a 37° C de AAPH. Se seleccionaron los compuestos **1**, **2**, **3** y **6** y su consumo mediado por radicales peroxilo, fue seguido por espectroscopia UV-Vis y/o por fluorescencia.

La emisión de fluorescencia fue importante en la preparación de los siguientes experimentos, ya que nos permitieron trabajar a concentraciones bajas relacionado con el límite de detección de la técnica. La tabla 5 detalla los índices ORAC-FI para los derivados seleccionados junto con las propiedades fotofísicas:

Derivados	Índice ORAC-FL	Fluorescencia
1	5,9	λ_{exc} = 328 nm ; λ_{em} = 443 nm
2	9,4	No fluorescente
3	3,6	λ_{exc} = 360 nm ; λ_{em} = 460 nm
6	1,9	No fluorescente
Trolox	1,0	-

Tabla 5. Índices ORAC-FI para los derivados en estudio e información sobre las propiedades fotofísicas de los derivados.

En base a estas propiedades, los siguientes experimentos fueron diseñados para los derivados fluorescentes **1** y **3**, cuyas estructuras presentan un grupo hidroxilo y un grupo catecol respectivamente (figura 30).

Los derivados **2** y **6** no emitieron fluorescencia, debido a la presencia de un grupo metoxilo en posición *meta* con respecto al hidroxilo, así como también el sustituyente triclorometil en el derivado **6**, ambos ejerciendo un efecto electroattractor según las reglas de Hammett y por consiguiente, no aportando en el proceso de transferencia de carga en el estado excitado. De hecho se ha

demostrado experimentalmente que sustituyentes electrodonores en posición 3, 6 y 7 del anillo cumarina promueven y aumentan el rendimiento cuántico de fluorescencia.^[84]

Las cinéticas de reacción fueron desarrolladas utilizando las mismas condiciones experimentales que el ensayo ORAC-FI, concentraciones en el intervalo entre 0,3 μM y 2 μM para cumarina **1** y entre 0,5 μM – 7,0 μM para cumarina **3**. La concentración de AAPH fue de 18 mM, lo que corresponde según la ecuación 4 a una velocidad de generación de radicales peroxilo de 1,47 $\mu\text{M}/\text{min}$.^[94]

Para el estudio de cinéticas a concentraciones entre (50 μM – 1 mM) se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con una columna C18 y detector de arreglo de diodos (DAD).

En experimentos diferentes se incubó la solución de **1** o **3** a 37 °C en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4. Tras alcanzar la temperatura se adicionó un volumen determinado de AAPH llegando a una concentración final de 18 mM. La figura 35 muestra el consumo de los derivados **1** y **3** en función del tiempo, cinética seguida a través de medidas de fluorescencia. Los derivados **1** y **3** reaccionaron eficientemente con radicales peroxilo.

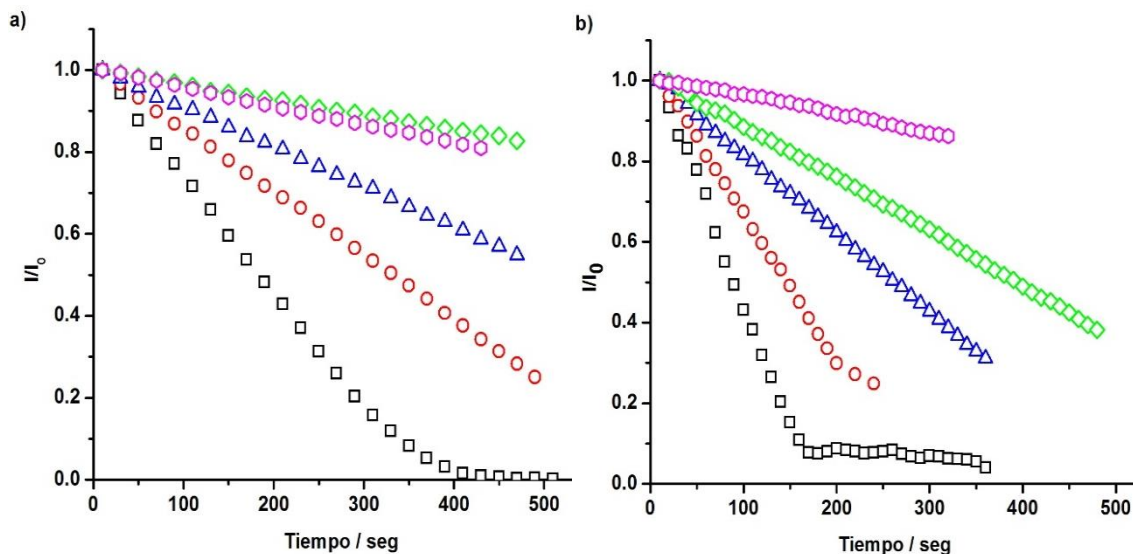


Figura 35. Cinética de consumo de hidroxycumarina **1** (a) y **3** (b) promovido por radicales peroxilo, monitoreada a través de medidas de fluorescencia.

Por otra parte, el estudio de la reacción de los compuestos **1** y **3** a concentraciones altas fue monitoreado por HPLC, de acuerdo a las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. El derivado **1** presenta un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 4,5 minutos y AAPH presenta un pico cromatográfico a 2,3 minutos. El derivado **3** presenta un pico cromatográfico a 3,9 minutos.

Las cinéticas de consumo de **1** y **3** en presencia de AAPH, fueron monitoreadas cada 30 minutos por 4 horas de reacción. La figura 36 muestra los cromatogramas para el consumo de los derivados **1**, **3** y AAPH, gráfico en el cual la flecha indica el transcurso del tiempo.

A partir de estos resultados, se evidencia una menor reactividad de **3** comparado con **1** contra radicales peroxilo. Los cuales fueron analizados con el programa HPLC-computer acoplado a ChemStation LC 3D.

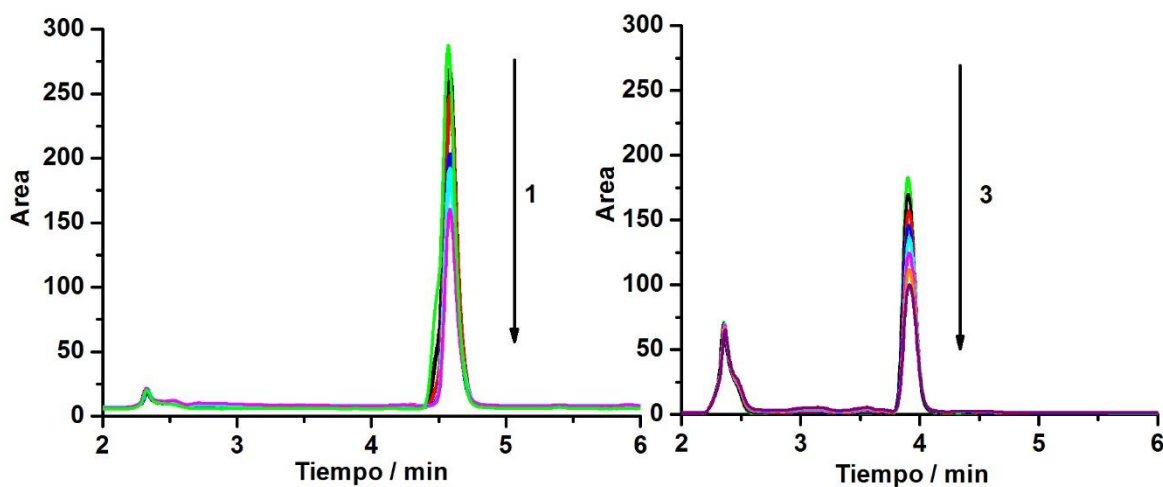


Figura 36. Cromatogramas para el consumo de los derivados **1** y **3** por oxidación debido a radicales peroxilo, en el cual la flecha indica el transcurso del tiempo de reacción.

Del análisis de la pendiente del gráfico de consumo de los derivados **1** y **3** (figura 35) a tiempo cero, junto con los datos obtenidos de consumo en el tiempo a través de HPLC (figura 36) se obtuvieron los gráficos de velocidad de consumo [$\mu\text{M}/\text{min}$] *versus* concentración de cumarina [μM] (figura 37a y 37b).

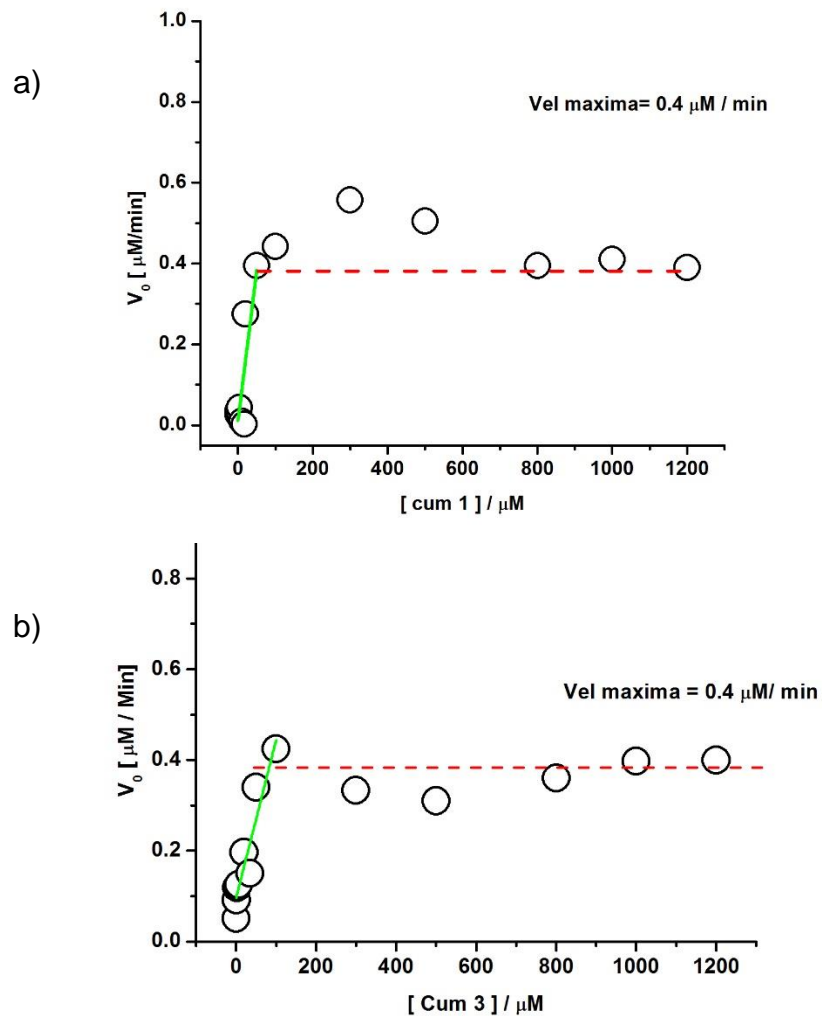


Figura 37. Dependencia de la velocidad inicial de consumo de los compuestos **1** (a) y **3** (b) con su concentración inicial.

Mediante la construcción de los gráficos de $\text{Log } v_0$ vs $\text{Log} [\text{derivado}]$ y su valor de pendiente, tanto para el derivado **1** y **3** es posible obtener los órdenes de reacción (figura 38).

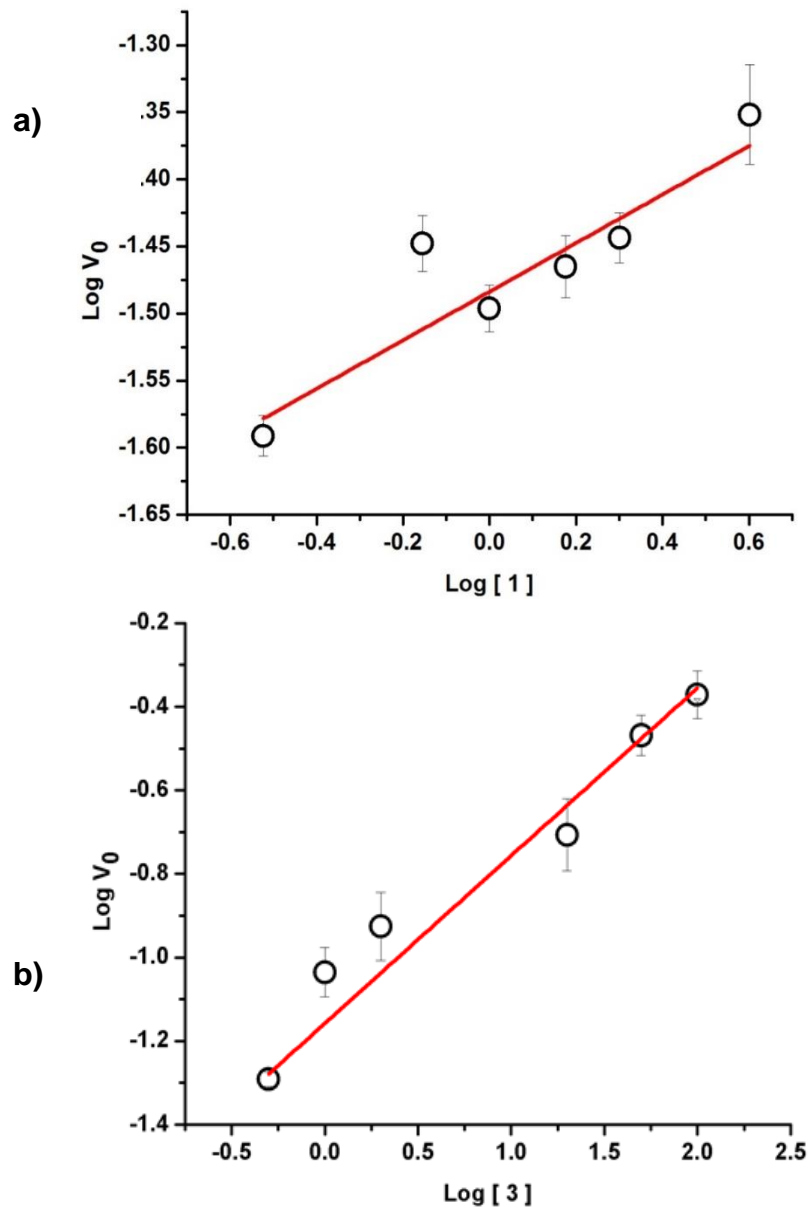


Figura 38. Gráfico Log Velocidad inicial V_0 versus Log concentración derivado 1 y 3 (a y b). $R^2= 0.78735$; $R^2=0.98068$.

El consumo de cada derivado en el tiempo puede definirse de la siguiente forma:

$$\frac{d[\text{Cum 1}]}{dt} = v = ak[\text{Cum}]^{0,2} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\frac{d[\text{Cum 3}]}{dt} = v = ak[\text{Cum}]^{0,4} \quad \text{Ecuación 6}$$

Si bien el parámetro *a* depende de la concentración y la reactividad de los antioxidantes adicionados, para una misma familia de compuestos, es posible asumir que *a* es similar en la ecuación 5 y 6. ^[95]

A baja concentración de **1** o **3** (menor a 100 µM) la velocidad de consumo de estos compuestos en la zona con pendiente positiva sigue una cinética de orden 0,2 en hidroxycumarina **1** y 0,4 en hidroxycumarina **3**; estos órdenes de reacción fraccionarios o decimales dan cuenta de la complejidad del mecanismo de reacción de estos derivados con ROO•. Asimismo, pueden existir otros factores que estén influyendo en el consumo de estos derivados, siendo incluso posible la generación de uno o más productos. Se evidencia que bajo estas condiciones cromatográficas no fue posible observar el o los productos de reacción.

A concentraciones mayores a 100 µM se llega a un valor constante de *v*₀, lo que significa que en el intervalo de concentraciones entre 100 µM y 1 mM la

cinética de reacción es de orden cero en cumarina siendo la máxima velocidad de consumo ($0,4 \mu\text{M}/\text{min}$) para **1** y **3**. De acuerdo a estos datos junto con el valor de $R_i = 1,47 \mu\text{M}/\text{min}$, cada molécula de **1** o **3** reacciona con aproximadamente cuatro radicales peroxilo.

Por otra parte, la linealización de la zona de concentraciones menores a $100 \mu\text{M}$ de cada compuesto permite estimar la relación de las constantes de reacción para **1** y **3** a través de la división de estos valores ($k_{\text{cum } 1} / k_{\text{cum } 3}$) obteniendo un valor aproximado igual a 2. En otras palabras **1** es dos veces más reactivo que **3** de acuerdo a las ecuaciones 5 y 6.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta la existencia de reacciones secundarias del radical semiquinónico que podría afectar la velocidad de consumo del compuesto neutro.

Estudio de reacciones secundarias a la reacción de hidroxycumarina con radicales peroxilo

Estudios anteriores han propuesto que ciertos derivados 1,4-dihidroxiados generan radicales 1,4-semiquinónico al reaccionar con radicales peroxilo y además pueden estar involucrados en reacciones secundarias en las cuales hay un consumo adicional de oxígeno y formación de peróxido de hidrógeno.^[96]

Para determinar la presencia de este tipo de reacciones se diseñaron dos tipos de experimentos tanto para **1** como para **3**: medidas de consumo de oxígeno y generación-cuantificación de hidroperóxidos.

En experimentos individuales se adicionó a una celda tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 estabilizando la temperatura a 37 °C en ausencia y presencia de **1** y **3**. La figura 39 muestra los perfiles de consumo de oxígeno de ambos compuestos. Al llegar a una temperatura estable y constante de 37° C se inició la medición de oxígeno. Transcurrido este tiempo, se inyectó al sistema una alícuota de solución madre de AAPH, de manera tal de tener una concentración final de 18 mM. Posteriormente, se dejó reaccionar por aproximadamente una hora para luego adicionar una alícuota de solución madre de **1** o **3** a una concentración final de 300 µM.

Al inicio de la medición se evidenció una línea horizontal correspondiente a la corriente detectada por el electrodo de oxígeno y dependiente de la presión de oxígeno presente en la solución de tampón fosfato. Tras adicionar AAPH se produce una disminución en la presión de oxígeno (pendiente negativa) debido al proceso de consumo de O₂ por la formación de radicales peroxilo manteniéndose a través del tiempo.

Al adicionar el compuesto **1** o **3** se produce la reacción de los radicales peroxilo con **1** o **3**, proceso que no cambia la pendiente de consumo de

oxígeno, por consiguiente las moléculas **1** y **3** no llevan a cabo ni promueven reacciones en cadena que induzcan un consumo adicional de oxígeno.

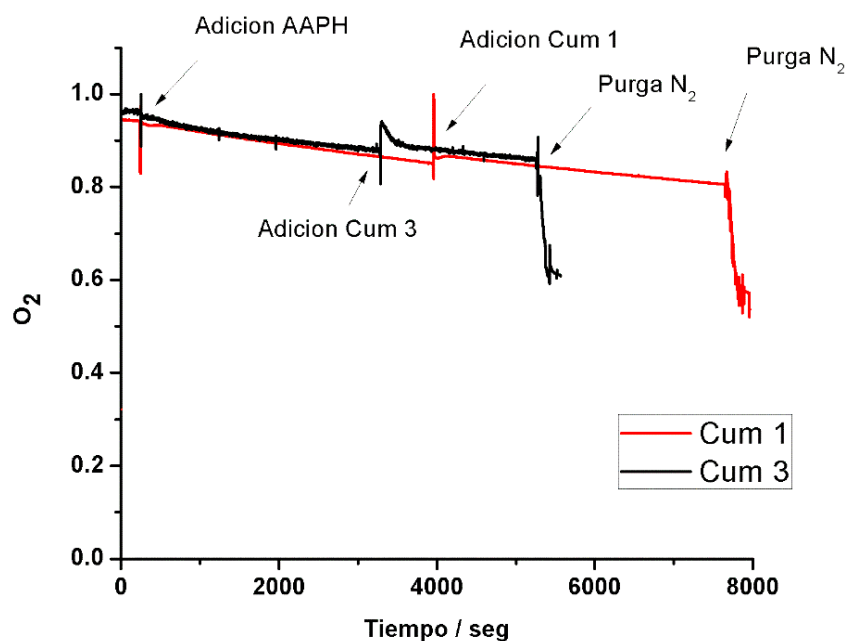


Figura 39. Gráfico de consumo de oxígeno a partir de la reacción de **1** y **3** con $ROO\cdot$.

La formación del radical semiquinónico en los grupos catecol en presencia de oxígeno molecular puede desencadenar reacciones de reducción de éste, para luego formar peróxido de hidrógeno y la quinona correspondiente como producto final (figura 40).

Para estudiar si el compuesto **3** en presencia y ausencia de AAPH produce peróxido de hidrógeno, se utilizó el método Fox.

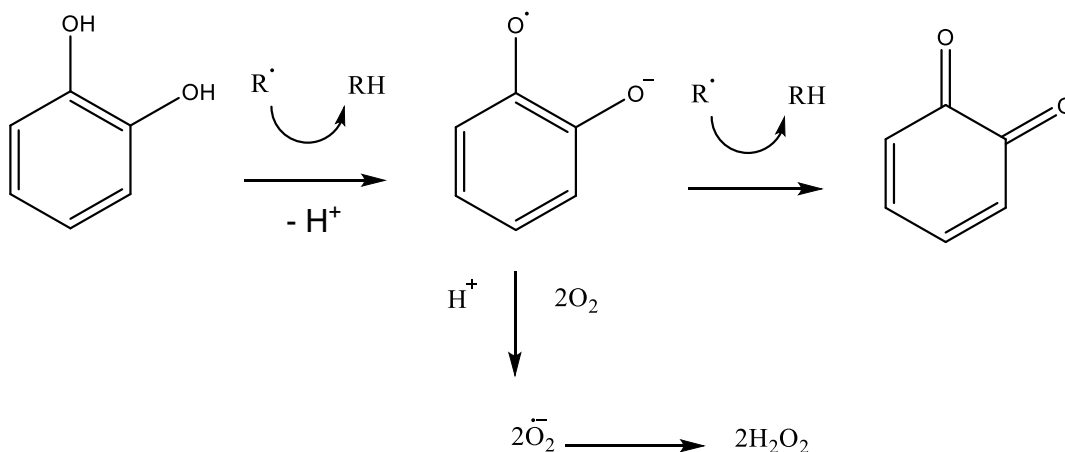


Figura 40. Formación de peróxido de hidrógeno a partir de un radical semiquinónico.

Este ensayo se basa en la habilidad que poseen los hidroperóxidos para oxidar el ion Fe^{2+} a Fe^{3+} y este último para formar un complejo con el indicador anaranjado de xilenol, el cual presenta una banda de absorción a 560 nm.^[48] De esta forma, se puede cuantificar los hidroperóxidos totales generados por **3** mediante medidas de absorbancia.

Se evaluó el compuesto **1** como control negativo a una concentración de 50 μM . Posteriormente, la absorbancia fue interpolada en una curva de calibración preparada con peróxido de hidrógeno.

La figura 41 muestra el gráfico de barras para la eficiente reacción de los compuesto 1 y 3 en presencia y ausencia de AAPH y catalasa y con un tiempo de reacción de 20, 40 y 60 minutos y exposición de dos horas.

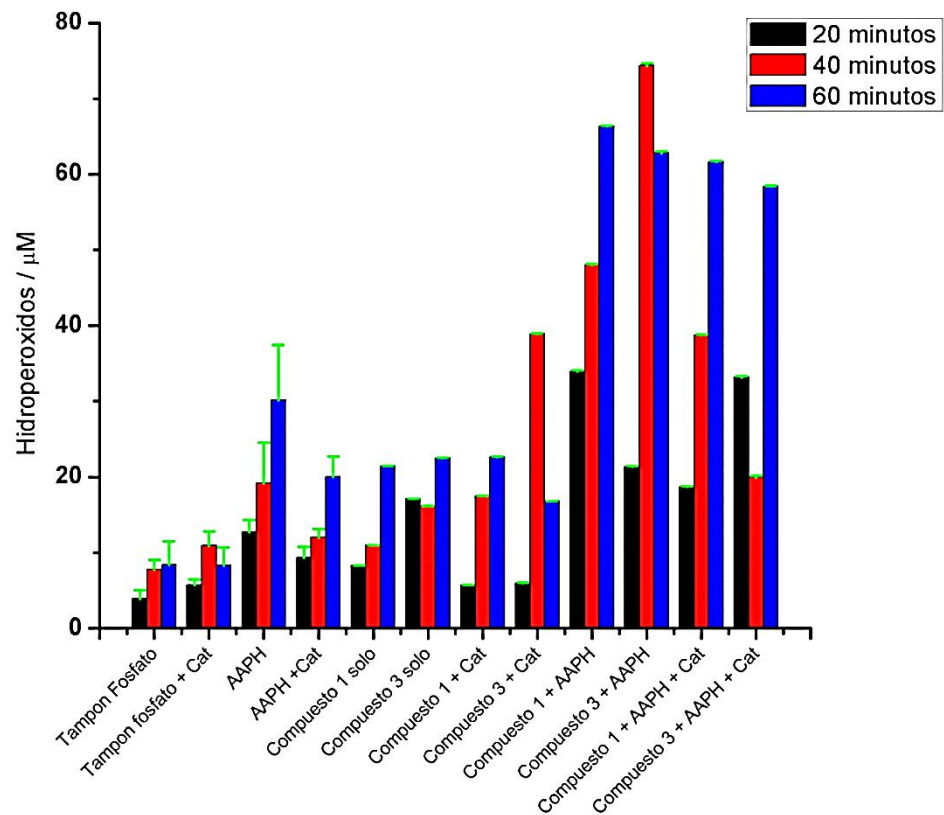


Figura 41. Gráfico de barras de concentración de hidroperóxidos *versus* muestras a tiempos 20, 40 y 60 minutos de reacción.

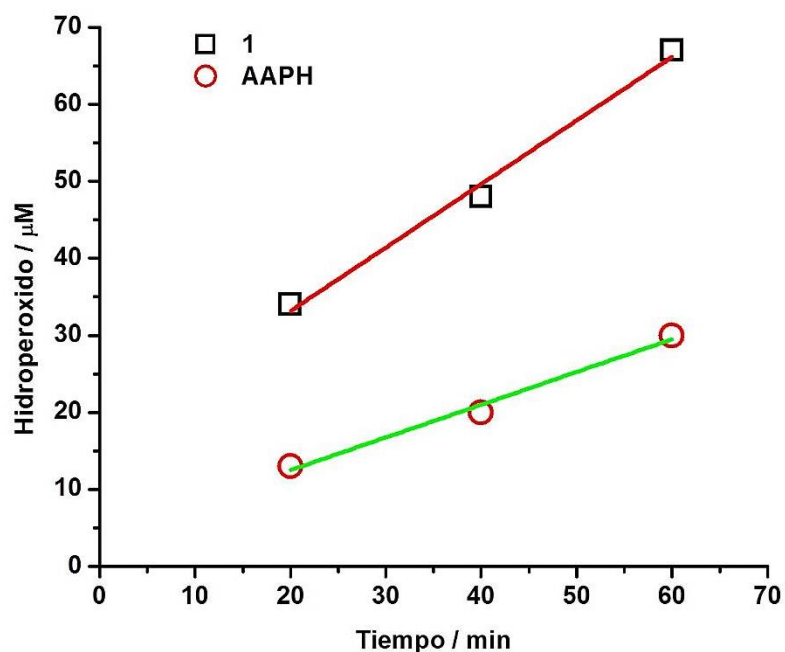


Figura 42. Gráfico de concentración de hidroperóxido *versus* tiempo de reacción para el derivado **1** y AAPH.

Además, es posible obtener la velocidad de formación de hidroperóxidos para **1** con una velocidad de $0,83 \mu\text{M}/\text{min}$. En cambio la velocidad de formación de hidroperóxidos provenientes de AAPH tiene un valor de $0,43 \mu\text{M}/\text{min}$ (figura 42).

Al observar el cambio en la concentración de hidroperóxidos a 60 minutos de reacción entre **3** y AAPH a 37°C en presencia y ausencia de catalasa, se comprueba la formación de aproximadamente $5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , es decir, tras una hora de reacción sólo un 10% de la concentración inicial de **3** genera peróxido de hidrógeno.

A través de los experimentos de consumo de oxígeno se descarta la adición de oxígeno y la existencia de reacciones en cadena. Además, los resultados del método Fox permitieron eliminar la existencia de una sobreproducción de peróxido de hidrógeno. Por tanto, los valores de capacidad antioxidante no estarían influidos por este tipo de reacciones secundarias.

La dicotomía en los valores estequiométricos determinados experimentalmente junto con los reportados en la literatura han sido explicados a través de la baja reactividad de los compuestos en comparación con la reactividad de los radicales peroxilo.

Del análisis de los resultados presentados en esta tesis se evidencia que los tiempos de inducción evaluados empleando fluoresceína fueron significativamente superiores a lo esperado, en especial para el derivado **1**. Esto se podría explicar por una baja reactividad de fluoresceína frente a radicales peroxilo comparado con los derivados **1** y **3**. De esta manera en el sistema existirían reacciones de término de radicales peroxilo tal como se describe en las reacciones 11 y 12.



Estas reacciones dan cuenta de que una fracción de $\text{ROO}\cdot$ forman radicales alcóxilo, los que tienen una reactividad superior a $\text{ROO}\cdot$ ^[97] en

consecuencia podría oxidar más eficientemente a los derivados hidroxycumarínicos y fluoresceína.

Evaluación de la capacidad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina con radical hidroxilo mediante REE

Para evaluar la capacidad de *scavenging* de radicales hidroxilo que poseen los derivados en estudio se efectuó el ensayo denominado fenton no catalítico a través de medidas de REE. Éste fue desarrollado para la generación de tres especies reactivas radical $\text{OH}\cdot$, $\text{CH}_3\cdot$ y anión radical superóxido.^[49]

Este método fue modificado usando N,N-dimetilformamida como solvente, forma mediante la cual se generan radicales hidroxilo en ausencia de líneas hiperfinas adicionales provenientes de la generación de radical metilo y/o radical superóxido. La utilización del atrapador de espín DMPO permite la estabilización del radical $\text{OH}\cdot$ al formar un espín aducto el cual posee un perfil hiperfino característico de cuatro líneas e intensidad 1:2:2:1. Este perfil hiperfino se explica a través de la interacción hiperfina de un núcleo de nitrógeno y un núcleo de hidrógeno atribuido al atrapamiento del radical hidroxilo a un tiempo estandarizado de 5 minutos de reacción. Tal como se muestra en la figura 43 línea gris.

En experimentos por separado se evaluó la capacidad que poseen los derivados en estudio para reaccionar con $\text{OH}\cdot$ durante 5 minutos disminuyendo de esta forma la intensidad del espín aducto formado (figura 43; línea roja).

Todos los derivados con excepción del compuesto **5**, evidenciaron una disminución en la formación del espín aducto asociado a la disminución de radical OH•.

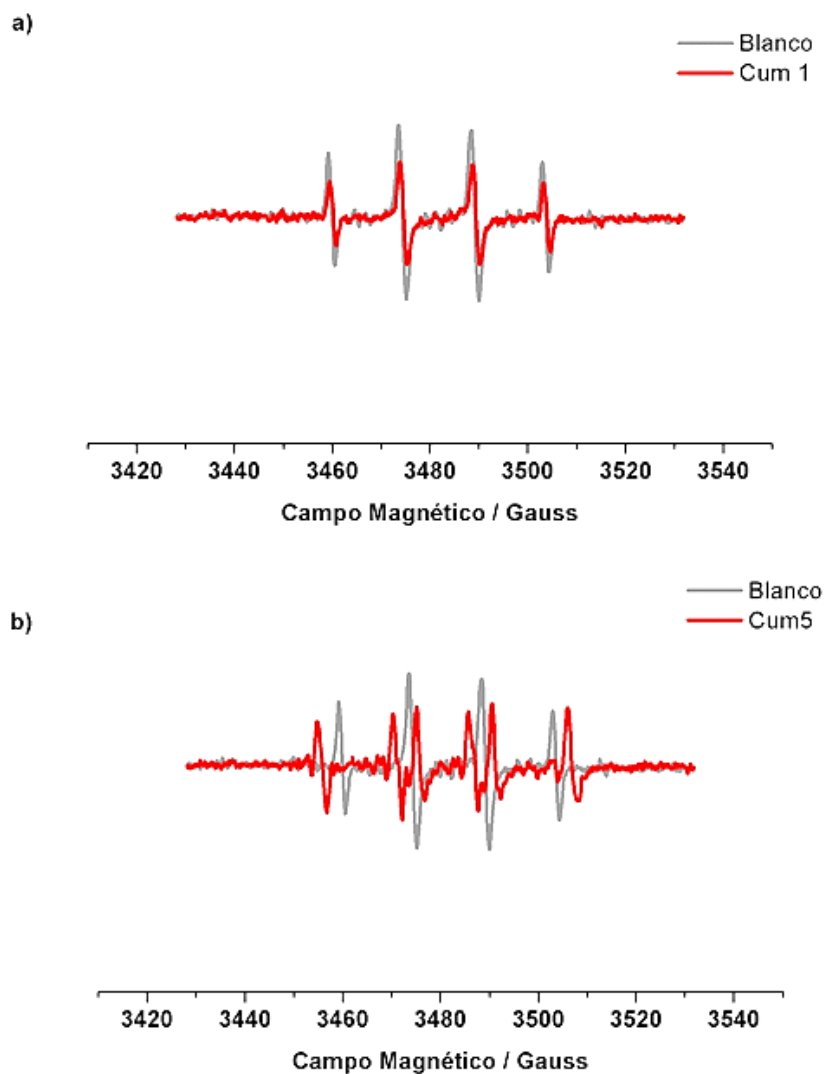


Figura 43. Espectros REE para el aducto DMPO-OH (línea gris) en ausencia derivados. Espectro REE para el aducto DMPO-OH en presencia de derivados 1 (a) y 5 (b).

Los derivados **3**, **4**, **5**, **6**, **7** evidenciaron mayor porcentaje de apagamiento, cuyos valores estuvieron influidos por el número y tipo de grupo de hidroxilo presente en el núcleo cumarina. Los compuestos con grupo catecol presentaron mayores valores de *scavenging* en comparación con los derivados **1** y **2**. Sin embargo, este *apagamiento* fue menor comparado con el compuesto **5** que presentó un 100 % de disminución.

El espectro REE de **5** presenta otro patrón hiperfino el cual puede explicarse en términos de un completo *apagamiento* del radical hidroxilo y el atrapamiento de otro tipo de radical con un patrón de seis líneas hiperfinas y un valor del parámetro g demostrando el atrapamiento de otro tipo de radical por DMPO el cual es atribuible al radical secundario que se encuentra centrado en carbono. (Figura 43b)

Los valores de porcentaje de *scavenging* para cada derivado se muestran en la tabla 6.

Derivado	Scavenging radical hidroxilo %
1	9,2
2	3,7
3	27,1
4	55
5	100
6	44,3
7	30,2

Tabla 6. Porcentajes de disminución de la señal del espín aducto DMPO-OH en presencia de las moléculas en estudio.

En este tipo de experimento el número de grupos hidroxilo es un factor estructural determinante en la actividad antioxidante. Por esto, los derivados monohidroxilado presentan menores valores de *scavenging*.

La diferencia entre los derivados con grupo catecol y el derivado **5** con grupo resorcinol se debe principalmente a los puentes de hidrógeno formado entre los grupos hidroxilos de catecol junto con la formación de puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo pirona y el grupo hidroxilo en la posición 8 en los derivados **6** y **7**, este tipo de interacción intramolecular no se presenta en el grupo resorcinol del compuesto **5**.

Asimismo, es posible asociar la capacidad de *scavenging* de $\text{OH}\cdot$ a las condiciones experimentales, el sistema tiene un pH promedio de 8, es por esto que los derivados **1** y **2** presentan los porcentajes más bajos, los valores de pKa de cada derivado también son un factor a tomar en cuenta para explicar la actividad antioxidante.

Influencia de los valores de pKa de los derivados monohidroxilado y dihidroxilado

Los valores del parámetro pKa asociado a la ionización de los derivados de hidroxycumarina a un determinado pH fue determinada mediante la técnica de fluorescencia a diferentes valores de pH utilizando el tampón Britton Robinson a una concentración de 0,1 M cuyo intervalo de pH va desde valores 2 a 12.

Se seleccionaron dos compuestos de la serie en estudio la cumarina **1** y **3**. Las condiciones experimentales del ensayo de *scavenging* del radical $\text{OH}\cdot$ mediante REE indican un pH de trabajo de 8. La figura 44 muestra los gráficos obtenidos de intensidad de fluorescencia versus pH para ambos derivados.

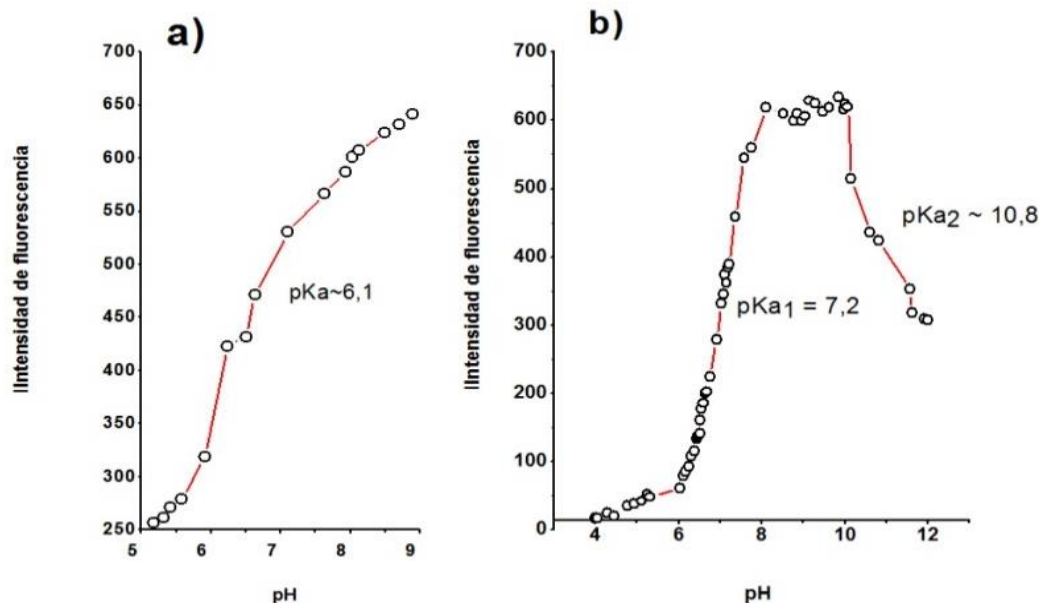


Figura 44. Gráficos de intensidad de fluorescencia versus pH para ambos derivados.

Mediante la ecuación de Herderson-Hasselbach (ecuación 7) se calculó la razón de hidroxycumarina ionizada y la especie protonada.

$$pH = pKa + \log \frac{ArO^-}{ArOH} \quad \text{Ecuación 7}$$

De acuerdo a esto el derivado **1** con un pKa aproximadamente de 6,1 presentaría una ionización de un $\approx 79\%$. El derivado **3** cuyo primer pKa es 7,2 (valores experimentales de pKa 7,35 y 11,72)^[98] se encuentra disociado un 6,3%. En resumen tanto el número de grupos hidroxilo presentes en cada compuesto junto con el porcentaje de ionización son los factores importantes

que da explicación a la capacidad de *scavenging* frente a radical hidroxilo de ambos derivados (tabla 6).

Caracterización y estudio de las propiedades electrónicas y conformacionales de los derivados de hidroxycumarina en estado neutro y radicalario, utilizando metodologías de la mecánica cuántica.

El estudio de las propiedades electrónicas y conformacionales de los derivados de hidroxycumarina en estado neutro y radicalario mediante metodologías de la mecánica cuántica permitió obtener los confórmeros más estables. Estructuralmente, todos los derivados presentaron planaridad en el núcleo cumarínico y el compuesto **7** presentó conformación silla en su endociclohexano.

La energía del orbital molecular de mayor nivel ocupado (HOMO) es un importante parámetro que nos entrega información acerca de la estructura electrónica molecular. Compuestos que poseen un bajo valor HOMO tienden a tener menor habilidad para donar o ceder electrones. Por el contrario, valores altos de HOMO implica que la molécula posee buenas propiedades electrodonoras.^[99]

Se conocen al menos dos mecanismos relacionados con procesos de *scavenging* de especies reactivas. Transferencia directa de un átomo de hidrógeno (mecanismo HAT) y transferencia de un electrón seguido por una transferencia de un protón (SET-PT).

Sin embargo, se ha postulado que este último mecanismo puede efectuarse en otro orden, primero la transferencia de un protón y luego la transferencia de un electrón. Estos mecanismos pueden co-existir en sistemas biológicos y químicos. Para algunos sistemas en particular el mecanismo antioxidante es definido sólo por los valores HOMO.^[100, 101]

Los valores de energía HOMO se presentan en la tabla 7. Asimismo, se tabulan los valores de potencial de oxidación junto con el valor de $\Delta G_{\text{oxid},298\text{ K}}$.

Para determinar el valor de la energía libre de Gibbs se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{oxidación},298\text{ K}} = [(E_{\text{ArO}\cdot} + E_{\text{H}_3\text{O}^+}) - (E_{\text{ArOH}} - E_{\text{H}_2\text{O}})] * 620,5095 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

$E_{\text{ArO}\cdot}$: Energía obtenido para la especie radicalaria usando un nivel de teoría 6-31+g** tight.

$E_{\text{H}_3\text{O}^+}$: Energía obtenida para la molécula de hidronio un nivel de teoría 6-31+g** tight.

E_{ArOH} : Energía obtenida para la molécula neutra un nivel de teoría 6-31+g** tight.

$E_{\text{H}_2\text{O}}$: Energía obtenida para la molécula de agua un nivel de teoría 6-31+g** tight.

La tabla 7 resume los valores de $\Delta G_{\text{oxid},298 \text{ K}}$ obtenidos para el proceso de oxidación junto con los valores de potencial de oxidación, energías HOMO.

Derivado	Potencial de oxidación vs electrodo Ag, AgCl/KCl [V]	$\Delta G_{\text{oxidación } 298 \text{ K}}$ [kcal/mol]	Valores HOMO [Kcal]
1	0,74	153,0	-151,9
2	0,65	152,5	-151,9
3	0,33	147,8	-139,2
4	0,75	154,4	-154,2
5	0,68	151,9	-154,2
6	0,26	147,6	-146,2
7	0,22 / 0,09 (Epc)	145,8	-141,1

Tabla 7. Valores de Potencial de oxidación, $\Delta G_{\text{oxid}, 298 \text{ K}}$ y energías HOMO para las moléculas en estudio.

A partir del análisis de los valores presentados en la tabla 7 se observa que existe una completa correlación entre las energías de HOMO (Orbital molecular de alta energía) para las moléculas neutras con el potencial de oxidación experimental.

La determinación de la densidad de espín fue realizada usando el análisis poblacional NPA, método que permite particionar la densidad

electrónica o en su defecto, la función de onda en cargas localizadas sobre los núcleos.

Además, es posible obtener ocupaciones y cargas en la cual no se utilizan los orbitales moleculares directamente sino que se recurre a los orbitales naturales que son las funciones propias de la matriz densidad reducida de primer orden. Estos orbitales naturales están localizados y son ortogonalizados. Por tanto, al realizar la diferencia de densidades de los orbitales alfa y beta se obtiene el porcentaje de densidad de espín obtenida para cada átomo.

La figura 45 muestra las densidades de espín para los derivados monohidroxilados **1**, **2**, **4** y el derivado **5** con el grupo resorcinol, cuyas estructuras presentan los mayores porcentajes en el núcleo cumarínico, explicando la formación del espín-aducto con PBN. Las densidades de espín fueron concordantes con los valores de constante de acoplamiento experimentales y simulados.

Estos datos permiten correlacionar los espectros REE de los derivados **3**, **6** y **7**. Recordando que para el compuesto **3** se determinaron acoplamientos hiperfinos entre los núcleos de hidrógeno presentes en las posiciones 3, 5 y 8 con constantes hiperfinas $a_H=0,65$ G, $a_H=0,67$ G, y $a_H=2,00$ G, así como un $a_H=0,52$ G para tres núcleos de hidrógeno equivalentes del metilo en posición 4. La densidad de espín en **3**, se deslocaliza a través de todo el núcleo cumarínico.

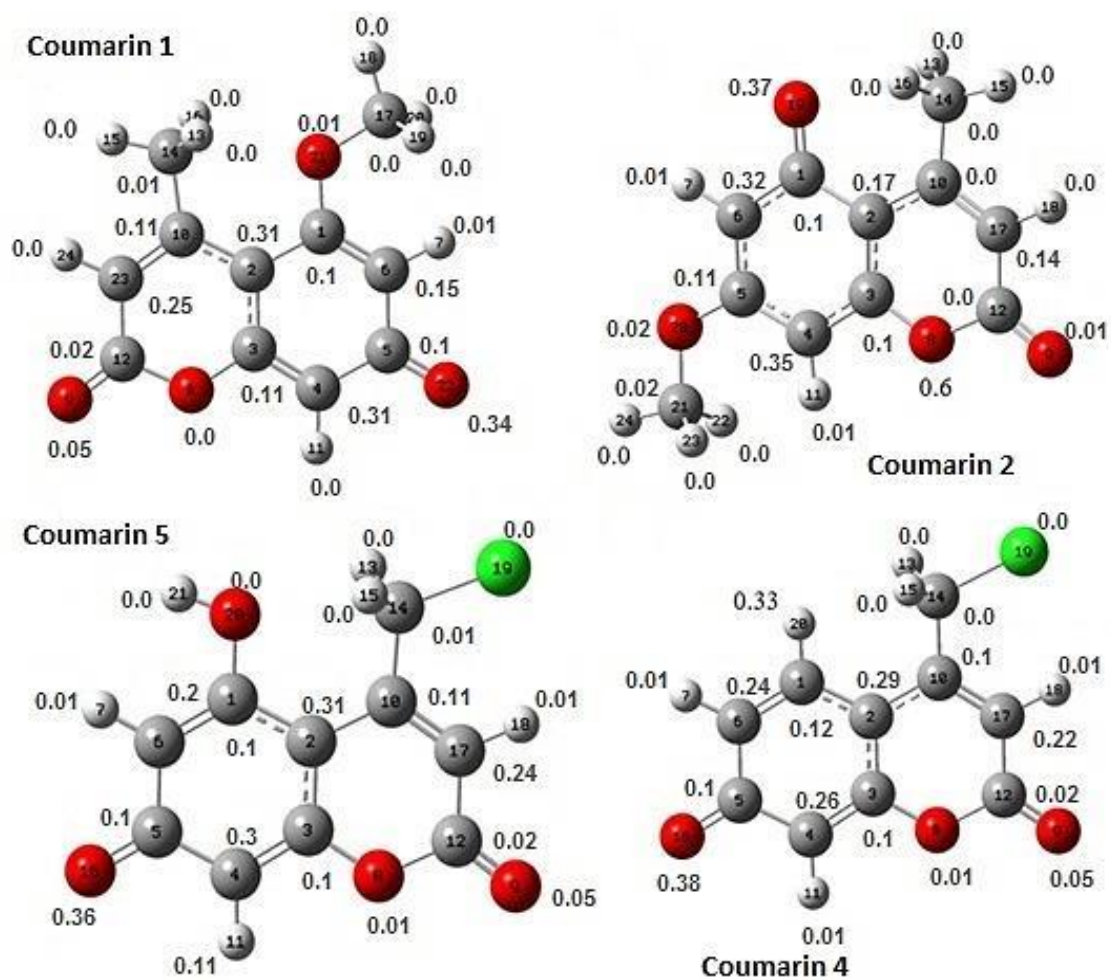


Figura 45. Análisis NPA obtenida para los compuestos 1,2 ,4 y 5.

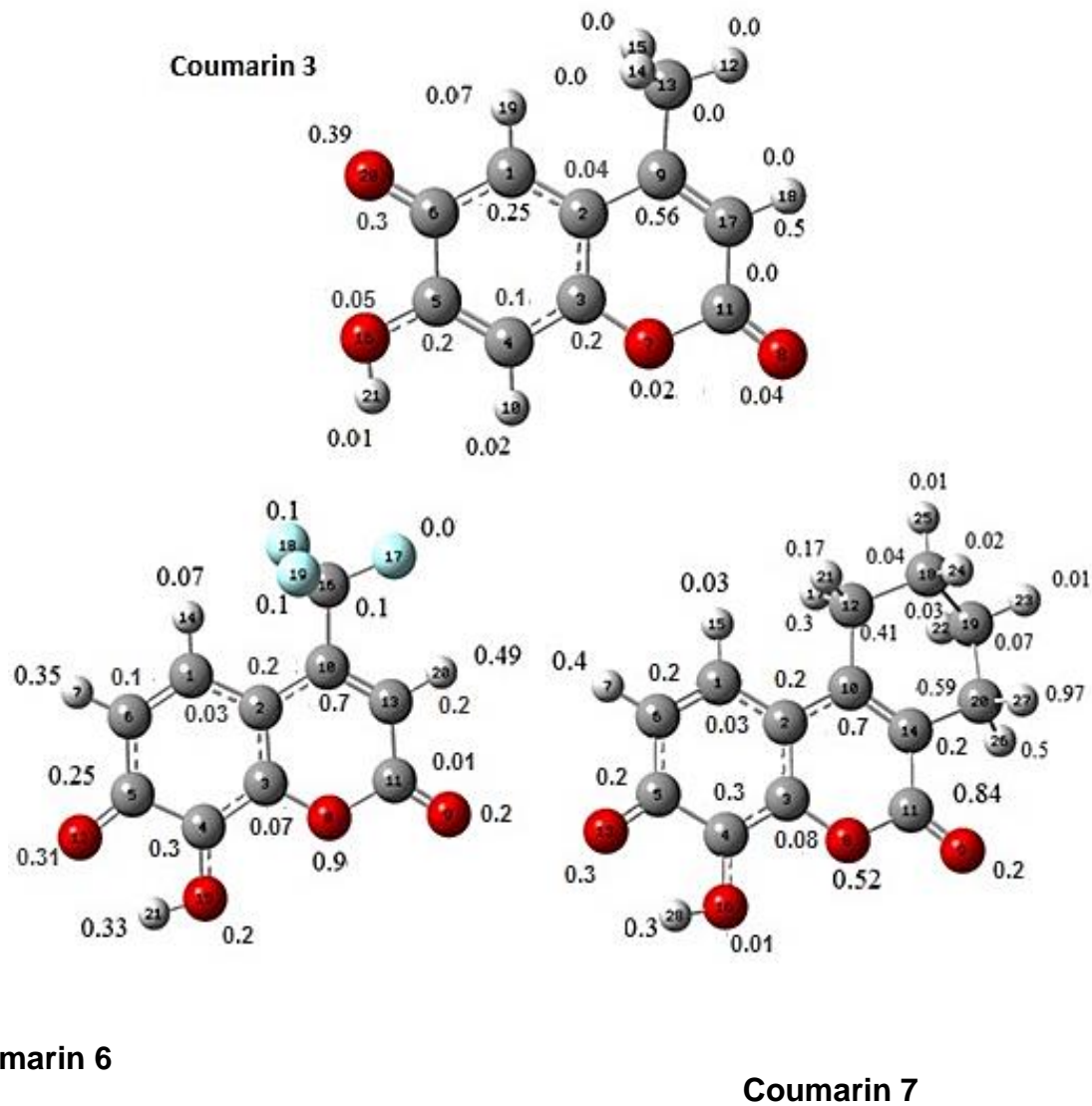


Figura 46. Análisis NPA obtenida para los compuestos 3, 6 y 7.

La densidad de espín en la estructura del compuesto 6 se encuentra principalmente distribuida en la parte superior del núcleo cumarínico entre los carbonos 3, 4, 4a, 5, 6, correlacionando con los acoplamiento hiperfinos de los

núcleos de hidrógeno en posición 3,5 y 6, explicados anteriormente. Las doce líneas hiperfinas en el espectro REE del compuesto **7** fueron explicadas a través de los acoplamientos de los hidrógenos en la posición 5, 6, y tres hidrógenos equivalentes presentes en el endociclohexano, estos acoplamientos coinciden con las densidades de espín de **7**. (figura 46)

Racionalización de los resultados de capacidad antioxidante con valores de parámetros obtenidos mediante el estudio teórico

Existen dos principales mecanismos para explicar las propiedades antioxidantes de un determinado compuesto: transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y transferencia de un electrón (SET-PT). Además, es posible la existencia de mecanismos secuenciales: Transferencia de un electrón seguido de transferencia de protón, mecanismo SPLET referido como pérdida de un protón secuencial y entrega de un electrón, pérdida de un electrón seguido de transferencia de un protón.

El esquema de la figura 7 permite describir los parámetros que influyen termodinámicamente en los diferentes mecanismos y utilizando los datos obtenidos del estudio teórico fue posible distinguir entre HAT, SET-PT y/o SPLET.

Los diferentes mecanismos son definidos como sigue:

Mecanismo HAT



Mecanismo SET-PT



Por tanto, la reacción 13 es directamente la abstracción de un átomo de hidrógeno mientras que la reacción 14 es racionalizada asumiendo la formación de un intermediario catiónico como paso inicial.

El mecanismo SPLET, resulta de la formación del anión fenóxido (ArO^-) como primer paso (reacción 16) y segundo paso la transferencia de un electrón (reacción 17). Estos procesos están gobernados por la afinidad de protón (PA) y por la entalpía de transferencia de electrón (ETE).

Mecanismo SPLET



A pesar de que los tres mecanismos envuelven intermediarios diferentes el resultado neto es el mismo.

Como primer análisis, los bajos valores obtenidos para las energías HOMO de **1**, **2**, **4** y **5** concuerdan con los valores de potencial de oxidación experimentales. Estructuralmente, no pueden formar puentes de hidrógeno intramolecular por esto es que pueden estar envueltos en un mecanismo antioxidante HAT.

Los compuestos con grupo catecol **3,6** y **7** podrían seguir el mecanismo SET debido a sus altos valores de energía HOMO y a la formación de quinona como producto final.

En un segundo análisis, el mecanismo HAT depende únicamente de los valores de entalpía de disociación de enlace (BDE) mientras que los valores de potencial de ionización (I_p) y la afinidad de protón (PA) son los valores limitantes para los mecanismos SET-PT y SPLET, respectivamente. Estos valores se muestran en la tabla 8.

Al comparar los valores de los parámetros para **1** y **2**, el derivado **2** posee menor BDE, igual afinidad de protón y mayor valor de I_p que el derivado **1**. Por consiguiente este derivado actúa a través de un mecanismo HAT mientras que **1** sigue un mecanismo SPLET. Esto último es ratificado al analizar

el valor de pKa experimental aproximado (~6,4) junto con su potencial de oxidación, es decir, transferencia de un protón seguido de un electrón.

Los compuestos **4** y **5** presentan iguales valores de afinidad de protón y baja diferencia entre sus valores de BDE (0,6 kcal/mol). De la comparación de los valores de Ip, ETE y PDE, el derivado **4** sigue un mecanismo SPLET mientras que **5** actúa por un mecanismo SET-PT.

Al comparar los diferentes parámetros para los derivados **6** y **7** se diferencia entre un mecanismo SPET y HAT, respectivamente. Por último, al comparar los valores obtenidos para el derivado **3** se encuentra el menor valor de PA (39,4 kcal) y un menor valor de Ip (137,4 kcal) en comparación con todos los derivados de acuerdo a esto el mecanismo antioxidante para **3** sería SET-PT. Esto concuerda con la capacidad electrodonora del OH del grupo catecol que estabiliza el radical $\text{ArO}\cdot^{[102]}$ con su bajo valor de potencial de oxidación y con los valores de pKa experimentales.

Derivado	BDE [kcal/mol]	IP [kcal/mol]	PDE [kcal/mol]	PA [kcal/mol]	ETE [kcal/mol]
1	92,5	138,1	267,6	33,8	85,3
2	90,6	139,3	265	33,8	83,5
3	88,7	137,4	265	39,4	75,9
4	93,1	145,6	261,3	31,9	87,9
5	93,7	143,7	263,8	31,9	88,5
6	87,4	146,8	254,4	26,3	87,9
7	84,9	138,1	260,6	31,3	80,3

Tabla 8. Valores de los parámetros BDE, IP, PDE, PA y ETE obtenidos a partir de los valores teóricos para los conformeros de menor energía.

Estudio de los derivados de hidroxycumarina en modelos de membrana

Ensayo de permeabilidad paralela en membrana artificial

La difusión pasiva a través de membrana se determinó utilizando el ensayo de permeabilidad paralela en membrana artificial (pampa). La placa presenta pocillos dadores y aceptores se prepararon siguiendo la metodología descrita en la sección anterior.

La solución madre de **1** y **3** fue incorporada a una placa de 96 pocillos la cual contiene la membrana de fosfatidilcolina previamente formada. Luego de un tiempo de dos horas de agitación se midió la absorbancia de los pocillos dadores y de los platos aceptores.

Los coeficientes de extinción molar previamente determinados fueron usados para cuantificar la concentración en cada pocillo (**1** $\lambda = 328 \text{ nm}$; $\epsilon = 20220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y **3** ($\lambda = 360 \text{ nm}$; $\epsilon = 23091 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Los datos de absorbancia para el receptáculo aceptor no pudieron cuantificarse ya que estuvieron fuera del límite menor de detección para la técnica de espectrofotometría, es decir, prácticamente fueron cero.

Las medidas de los receptáculos donores permitieron determinar que el compuesto **1** se encuentra asociado en un $93,7 \pm 0,1 \%$ a la membrana y el compuesto **3** en un $94,1 \pm 0,1 \%$ ($n=3$).

Determinación de Coeficiente de partición liposoma/tampón a pH 7,4 de derivados de hidroxycumarina

El logaritmo del coeficiente de partición en octanol/agua es una medida del hidrofobicidad de compuestos y se asume como la representación general de la partición de un compuesto entre una fase acuosa y una fase orgánica. No obstante, cuando se relaciona este concepto a un sistema liposoma/tampón resulta difícil determinar el volumen de liposomas, incluso asumir la región de lípidos como una fase homogénea. Además, es muy probable una mayor interacción de las moléculas con las membranas a partir de enlaces de hidrógeno u otras interacciones de tipo Van der Waals.

Por estas razones, junto con la información obtenida de los ensayos Pampa, resulta apropiado definir esta interacción a partir de una pseudo constante de asociación.^[103-105]

Para determinar la fracción de compuestos **1** y **3** asociados a las membranas y/o a los grupos polares presentes en las cabezas de los fosfolípidos, se determinó la pseudo constante de asociación K. La cual se define como:

$$K_{\text{pseudo}} = \frac{\text{fracción de compuesto X en lípidos} / [L]}{\text{fracción de compuesto X en agua} / [W]} \quad \text{Ecuación 9}$$

Definiendo [L] concentración de lípidos y [W] concentración de tampón Tris pH 7,4 con una concentración final de 20 mM, las fracciones de compuesto en lípido y en tampón fueron determinadas por medidas de fluorescencia del sobrenadante, obtenido del proceso de ultrafiltración.

La tabla 9 presenta los resultados obtenidos para el compuesto **1** y **3**, junto con el porcentaje de compuestos enlazados a liposomas a una temperatura menor a la temperatura de transición de fase.

Compuesto	Kpseudo_{DPPC}	Kpseudo_{DPPC:EF}
1	236 ± 16	164 ± 16
3	1846 ± 275	997 ± 20

Tabla 9. Valores de pseudo constante de asociación para el compuesto **1** y **3** en liposomas de DPPC y DPPC:EF en una razón 50:50 (n=3).

Los datos tabulados en la tabla indican que ambos compuestos en presencia de una suspensión de liposomas se encuentran asociados a la fase lipídica. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos de los ensayos de permeabilidad en membrana artificial.

Estudio de la interacción de los derivados de hidroxycumarina en modelos de membranas a través de dinámica molecular

Este estudio fue realizado a través de dinámica molecular la cual se basa en la mecánica clásica además de la aproximación de átomos unidos. Por consiguiente, estos resultados deben necesariamente estar asociados a datos experimentales y de este modo comprobar si el modelo diseñado representa el comportamiento de los derivados en membranas lipídicas.

Los datos obtenidos de la dinámica molecular en un tiempo establecido de 100 μ s permitieron construir el gráfico de la densidad de masa en el eje z. Estos gráficos dan una distribución de la posición de cierto átomo del lípido a lo largo del eje perpendicular a la membrana.^[106, 107] Es decir, indica los lugares de interacción entre los derivados de hidroxycumarina y la membrana lipídica.

La figura 47 muestra el gráfico de densidad de masa el cual entrega información de la interacción de **1** con las diferentes regiones de la membrana. Se observa que dentro de todas las interacciones que puede establecer el compuesto **1** con la membrana lipídica son principalmente con el grupo colina y fosfato del lípido dimetilfosfatidilcolina (DPPC). Estas interacciones mayoritariamente de tipo Van der Waals pueden ser asignadas a las interacciones de tipo puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y algún oxígeno del grupo fosfato así como también interacciones de tipo catión-nube π entre la carga negativa parcial sobre y bajo el anillo benceno del núcleo cumarínico de **1** y la carga positiva del amonio cuaternario del grupo colina.

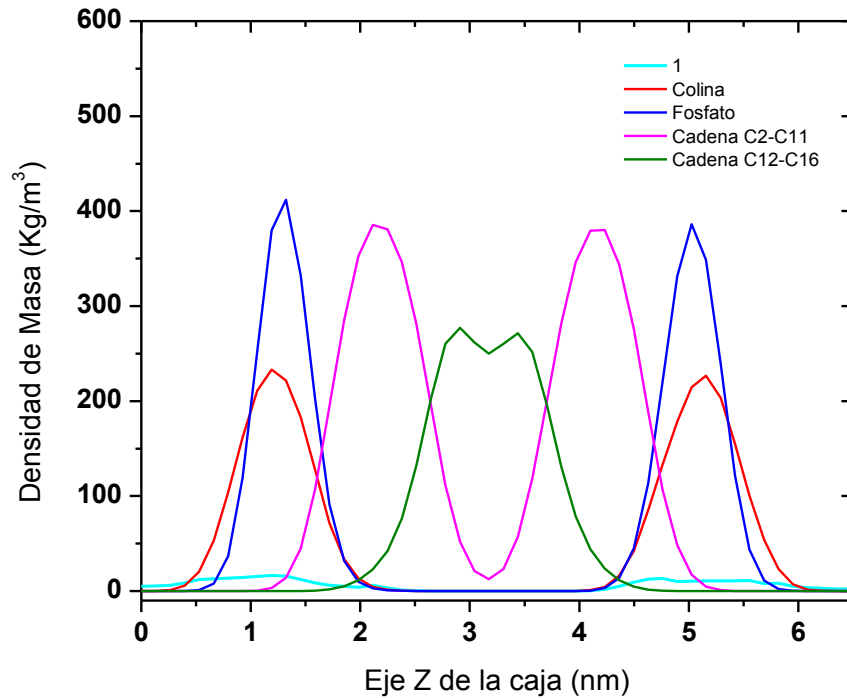


Figura 47. Gráfico densidad de masa para el sistema DPPC: 1.

A través del análisis utilizando el software VMD^[68] se obtuvo una imagen del sistema DPPC:1 (figura 48) que muestra en forma más descriptiva estos resultados. Con esto se confirma la existencia mayoritaria de este tipo de interacciones y además permite observar algunas moléculas localizadas en la región de la cadena de C2 y C6 de DPPC.

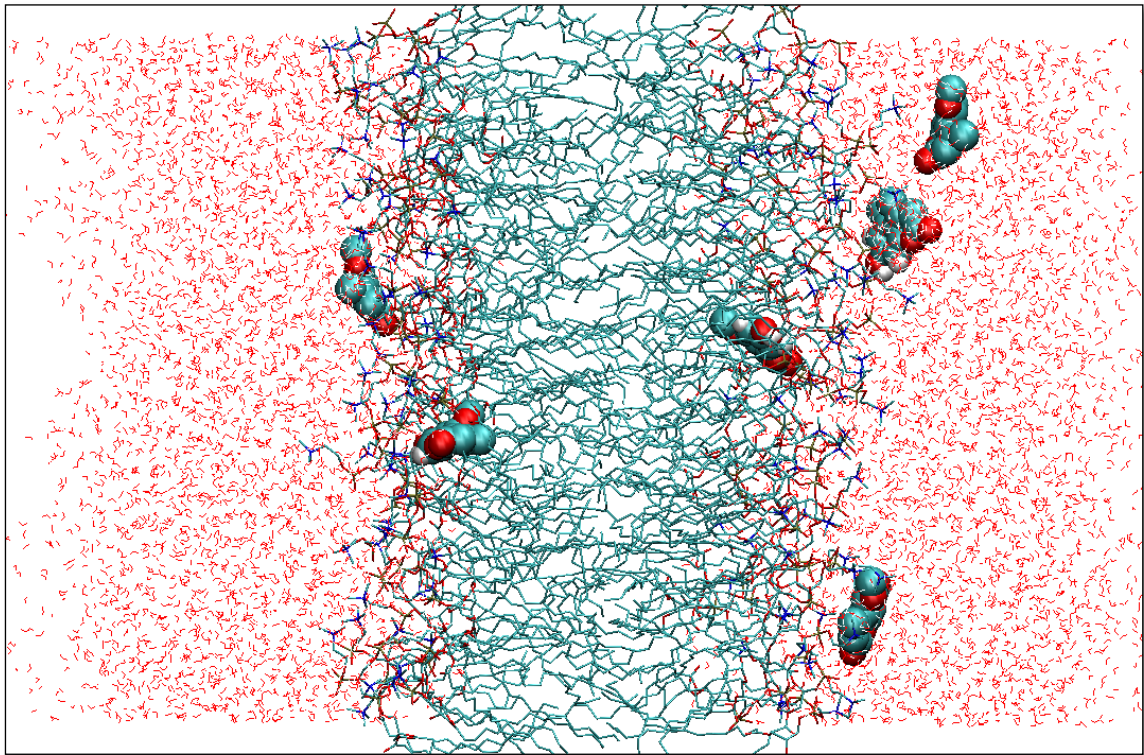


Figura 48. Imagen dinámica Compuesto 1 en membrana de DPPC.

Otra de las propiedades importantes son los parámetros de orden. Estos datos permiten determinar la modificación del “orden” que posee el sistema a través de la incorporación de los derivados. Experimentalmente se obtienen a través del estudio de los fosfolípidos marcados con deuterio mediante la espectroscopia de resonancia magnética nuclear $^2\text{H-NMR}$ determinando los acoplamientos cuadrupolares del enlace C-D de las cadenas hidrofóbicas. Este tipo de estudios han sido comparados con resultados experimentales y se ha establecido que estos valores tienen una buena correlación con datos obtenidos de dinámica molecular.^[108-111]

El gráfico de la figura 49 muestra los parámetros de orden obtenidos para DPPC en ausencia y presencia de **1**. La figura 49 (a) muestra datos experimentales que detallan un aumento en la fluidez de membranas debido a la incorporación de fosfolípidos insaturados a membranas de DPPC^[112] produciendo un aumento en los valores de parámetros de orden definidos como S_{CD}^{Plat} . Estos datos permiten establecer que la incorporación de **1** al sistema DPPC produce un leve aumento en la fluidez de membrana afectando especialmente a la cadena de los fosfolípidos desde el Carbono 8 al Carbono 15.

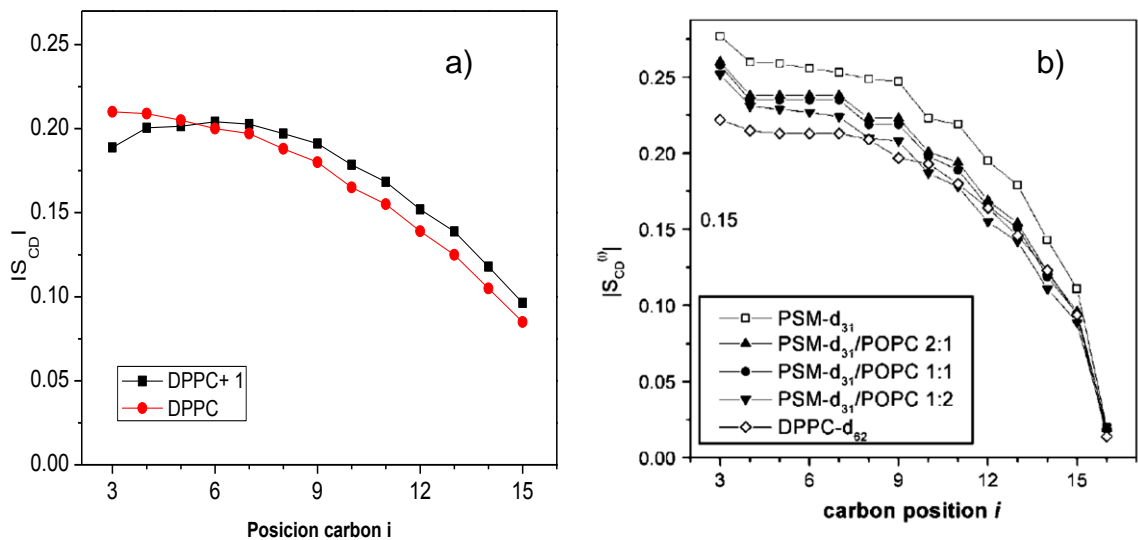


Figura 49. a) Parámetros de orden determinados para el sistema DPPC presencia y ausencia de **1**. b) Parámetros de orden obtenidos experimentalmente para DPPC y la mezcla con fosfolípidos insaturados.

Por otra parte, el gráfico de densidad de masa obtenido para el compuesto **3** muestra principalmente interacciones de tipo catión-nube π entre la carga parcial negativa producida en el anillo benceno del núcleo cumarínico con la carga positiva del amonio cuaternario del grupo colina. (figura 50)

Esto se observa en la figura 51 de manera más descriptiva en la imagen de la dinámica molecular del sistema DPPC: **3** evidenciando una localización aparente de **3** en la zona de las colinas.

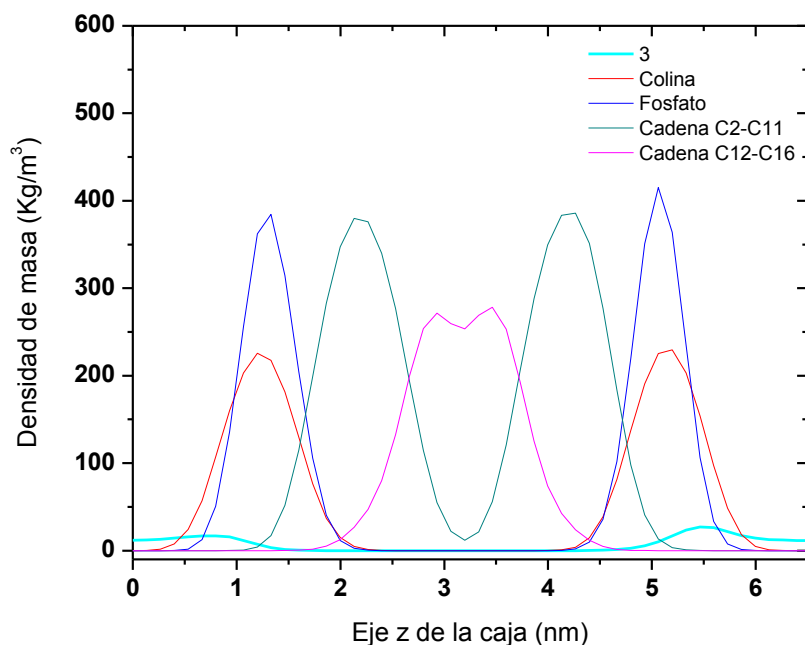


Figura 50. Gráfico densidad de masa para el sistema DPPC: **3**

A partir de esto se obtiene el gráfico de los parámetros de orden para este sistema donde no se observa cambios en la fluidez de membrana. (Figura 52).

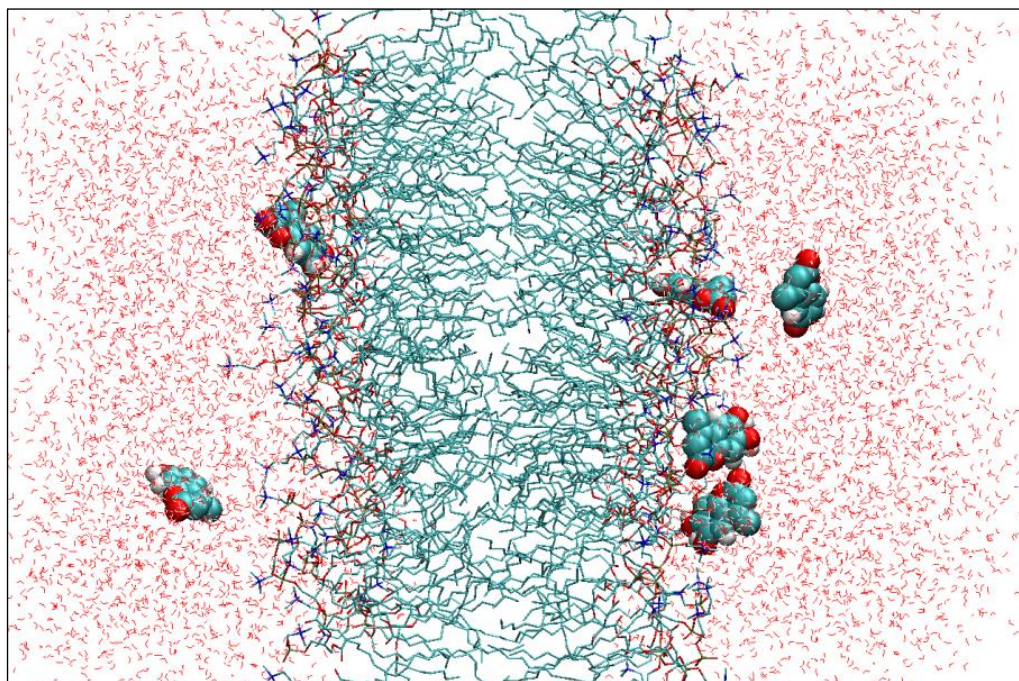


Figura 51. Imagen de la dinámica molecular del sistema DPPC: **3**

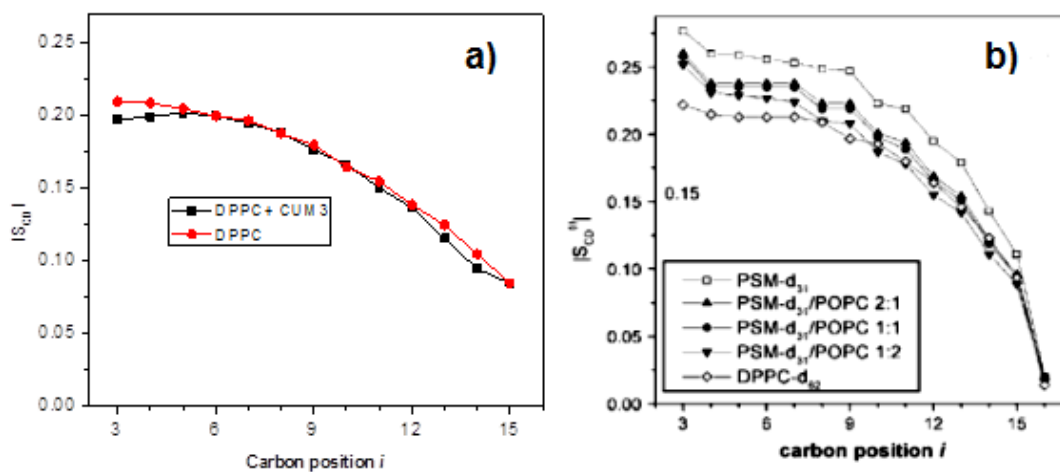


Figura 52. a) Parámetros de orden determinados para el sistema DPPC presencia y ausencia de **3**. b) Parámetros de orden obtenidos experimentalmente para DPPC y la mezcla con fosfolípidos insaturados.

Determinación de la capacidad antioxidante de derivados de hidroxycumarina en liposomas.

La capacidad antioxidante de los compuestos en estudio en liposomas utilizados como modelos de membrana fue evaluada a través de la oxidación de la sonda DPH mediada por ROO•.

Esta capacidad no pudo ser determinada debido a que la oxidación de la sonda a través de radicales peroxilo generados por el azocompuesto hidrosoluble AAPH no fue evidenciada. Esto podría deberse a la rigidez de la membrana DPPC en la cual los radicales peroxilo generados son pueden llegar al sitio de reacción.

Por esta razón, se realizó una variación en la composición del sistema, y se utilizó DPPC: EF en proporción 50:50. A pesar de que existe una mayor movilidad de las cadenas hidrófobas y se esperaba una mayor fluidez al incorporar esfingomielinina la difusión de los radicales ROO• no fue lo suficiente para llegar al sitio de reacción y por consiguiente no se observó una oxidación del sistema liposoma: DPH. En la figura 53 se muestra la orientación de la sonda DPH paralela a las cadenas de los fosfolípidos^[113] la que se encuentra inmersa interactuando con los grupos en los sistemas DPPC y DPPC:EF.

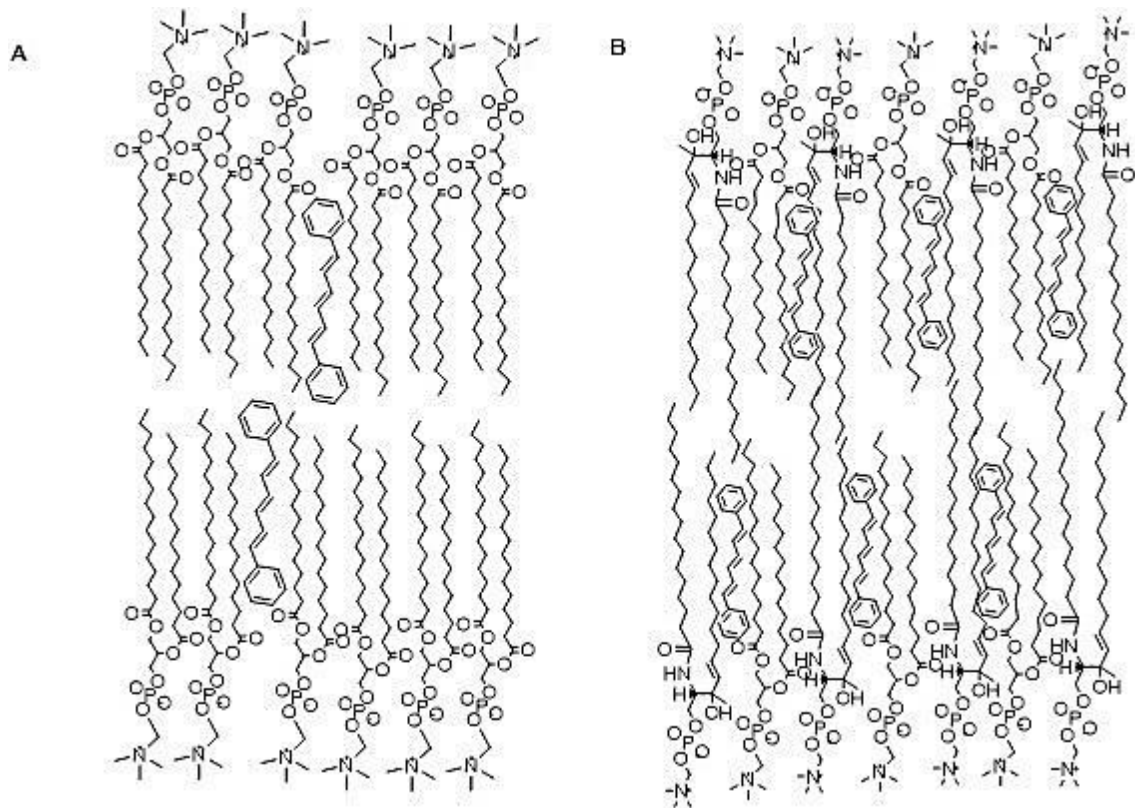


Figura 53. Localización de sonda DPH en el sistema DPPC (A) y DPPC: EF (B)

A pesar de la profundidad de la sonda en las membranas, al adicionar al sistema AAPH no se evidenció una disminución en intensidad de fluorescencia, manteniéndose en el tiempo en los dos sistemas y por consiguiente en el sistema DPPC: EF no hubo evidencia de oxidación.

Determinación de la capacidad antioxidante de derivados de hidroxycumarina en membranas de eritrocitos.

A diferencia de la preparación de liposomas en que existe una razón conocida de fosfolípidos saturados en insaturados, las membranas de eritrocitos son mucho más complejas. En términos de constitución, contienen cerca de un 50% de fosfolípidos, entre saturados e insaturados y estos últimos cerca de un 20% son esfingolípidos. Además, poseen proteínas de membrana y colesterol, este último tiene como función favorecer la fluidez de la membrana, para así facilitar procesos de transporte.

Para estos ensayos las membranas de eritrocitos fueron incubadas a 37°C por 24 horas con la sonda DPH a una concentración final de 6 μM , en ausencia y presencia de los compuestos **1** y **3** en concentraciones de 5, 10 y 20 μM .

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia de la sonda DPH en el tiempo a 37°C al adicionar 18 mM, concentración final de AAPH, como generador de radicales peroxilo.

La figura 54 muestra los perfiles cinéticos para el consumo de DPH en el tiempo en ausencia y presencia del compuesto **1**.

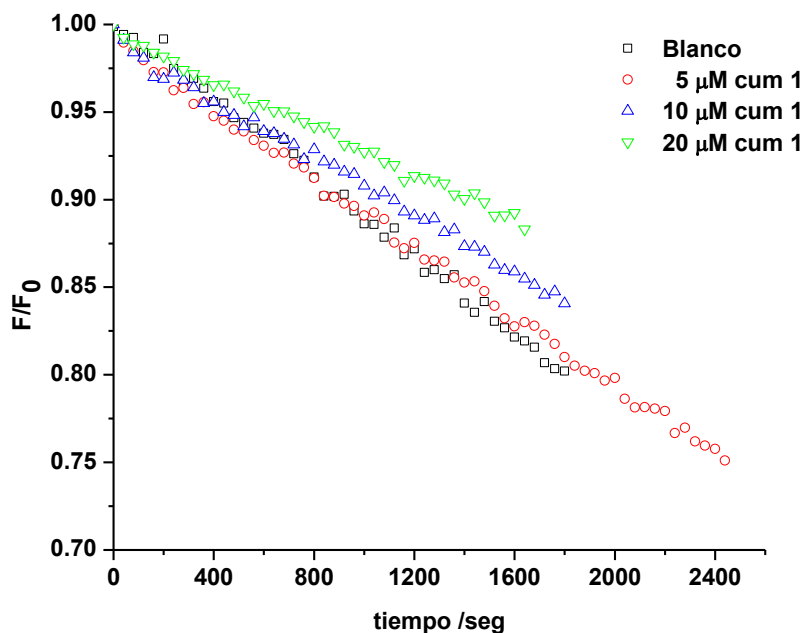


Figura 54. Cinéticas de consumo de DPH en membranas de eritrocitos en ausencia y presencia de compuesto **1** (n=3).

En ausencia de derivado **1** se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia debido a la oxidación de la sonda DPH mediada por ROO•. En presencia de diferentes concentraciones del derivado **1** se observó la protección de la sonda, siendo esta concentración-dependiente.

Asimismo, en ausencia del derivado **3** (figura 55) se produce una disminución en la intensidad de fluorescencia producto de la oxidación de la sonda DPH al igual que el comportamiento observado en la figura 54. Sin embargo, al incorporar al sistema diferentes concentraciones del compuesto **3** (5 μM y 10 μM) se evidenció una abrupta disminución en la intensidad de

fluorescencia hasta aproximadamente un 15 y 20 % de avance de la reacción. A 20 μM la cinética de consumo es prácticamente igual al blanco.

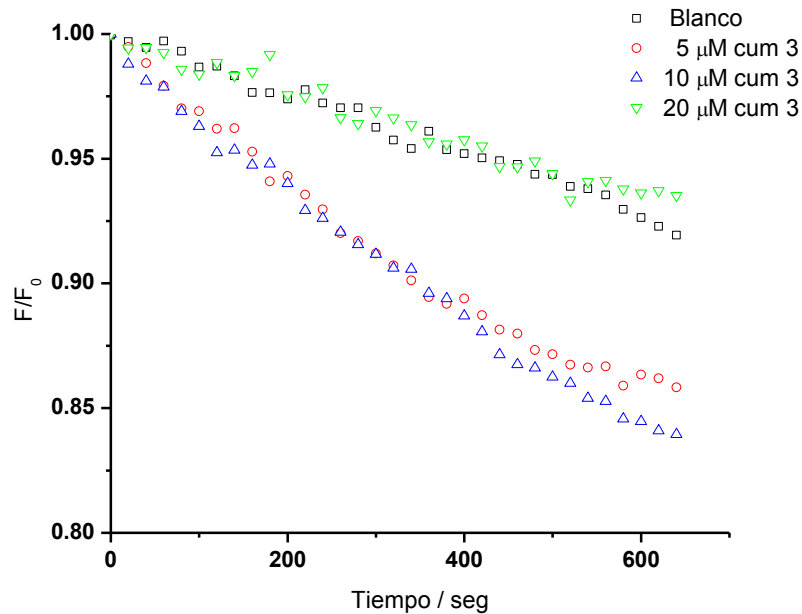


Figura 55. Cinéticas de consumo de DPH en membranas de eritrocitos en ausencia y presencia de compuesto **3**. (n=3)

De estos resultados obtenidos se desprende que, en ausencia de **1** o **3**, se lleva a cabo la oxidación de la sonda incorporada en las membranas de eritrocitos. Las diferencias en protección frente a procesos de oxidación serían debido a la diferencia en la reactividad entre ambos derivados.

Sin embargo, es difícil atribuir completamente este resultado a un sólo proceso, ya que en estos sistema reales existen una serie de procesos oxidativos paralelos debido a la composición de estas membranas con diferentes tipos de fosfolípidos, colesterol y proteínas hace que ésta presente

una mayor fluidez en comparación con los liposomas preparados. Una de las reacciones paralelas posibles puede ser la formación de *orto*-quinona como producto principal de **3** el cual podría reaccionar con los grupos sulfidrilos de proteínas constituyentes de estas membranas, produciendo así la oxidación de estas e influyendo en su capacidad antioxidante. Finalmente, debido a que en nuestras condiciones experimentales la generación de radicales peroxilo se produce en solución acuosa, la difusión de ROO• no sigue una distribución uniforme en la fase lipídica.^[114]

Discusión general

El presente estudio abordó las propiedades antioxidantes de siete derivados de hidroxycumarina los cuales se separaron en dos grupos, los derivados monohidroxilados y dihidroxilados.

El estudio electroquímico permitió proponer dos tipos de mecanismos llevados a cabo por los derivados **1-5** según los criterios de diagnóstico postulados por Nicholson & Shain de tipo CE_{irrev} . Por otra parte, el derivado **6** presentó otro pico anódico lo que fue atribuido a la presencia del grupo electroattractor fuerte fluorometilo. El compuesto **7** sigue un proceso oxidativo cuasireversible cuyos parámetros electroquímicos fueron independiente de la velocidad de barrido. Su potencial de pico catódico se desplazó a potenciales menos positivos en comparación con otros derivados dihidroxilados, este comportamiento es explicado según los criterios de diagnóstico como un proceso $EC_{cuasireversible}$. Todos los mecanismos de oxidación fueron controlados de forma difusiva hacia el electrodo de trabajo.

Mediante el estudio por resonancia de espín electrónico comprobamos la generación de radicales libres provenientes de los derivados en estudio. Estas especies radicalarias fueron de corta vida media, ya que se debió utilizar atrapadores de espín y quelantes para su posterior detección.

Asimismo, las distribuciones de la densidad de espín obtenidas mediante un cálculo NPA fueron concordantes con las constantes de acoplamiento hiperfino y la deslocalización del electrón por el núcleo cumarínico.

De acuerdo a este estudio inicial se propuso que los derivados con más de un grupo hidroxilo poseen mayor capacidad antioxidante que los derivados con un grupo hidroxilo.

Es por eso, que mediante el uso del ensayo ORAC utilizando la sonda fluoresceína se evaluó la capacidad antioxidante de los siete derivados de hidroxycumarina. Sin embargo, contrario a lo propuesto en el estudio preliminar de potenciales de oxidación y REE, se obtuvieron mayores valores de índice ORAC relativo a Trolox para los derivados **1** y **2** quienes poseen sólo un grupo hidroxilo. Los derivados dihidroxilados presentaron valores entre 3,5 y 1,9 siendo preponderante la sustitución en posición *orto* comparado con *meta*. Adicionalmente, los valores de estos índices ORAC-FI fueron graficados en función de los potenciales de oxidación experimentales. Resultado de esto, se concluyó que los parámetros antes mencionados no correlacionaron entre sí, por tanto la capacidad antioxidante no depende únicamente de este factor termodinámico.

La utilización de compuestos estándar (7-hidroxycumarina y 4-metil-5,7 – dihidroxycumarina) se realizó un análisis estructural de cada derivado en relación a sus sustituyentes. A pesar de que este análisis los efectos

electrónicos ejercidos por los diferentes sustituyentes no correlacionaron mayormente con los valores de índice ORAC obtenidos. Es posible establecer que la presencia del grupo hidroxilo en posición 7 favorece la actividad antioxidante.

De acuerdo a esto se profundizó en el estudio de otras variables implicadas en la capacidad antioxidante. Como primera etapa se estudiaron los perfiles cinéticos de consumo de fluoresceína evidenciando altos valores estequiométricos. Estos resultados condujeron al estudio de la capacidad antioxidante de los derivados **1** y **3** mediante ensayos ORAC-Py y ORAC-PGR.

Los perfiles cinéticos ORAC-Py en función del tiempo para **1** y **3** fueron distintos, en el primero no se observó tiempo de inducción mientras que en el segundo se obtuvo un perfil con un tiempo de inducción bien definido. Los valores ORAC relativos a Trolox fueron 0,1 y 1 para ambos derivados, respectivamente. Además, en el ensayo ORAC-PGR no se evidenció protección para ninguno de los derivados estudiados. Estos antecedentes conducen a proponer que tanto el derivado **1** y **3** son menos reactivos frente a radicales peroxilo que piranina y rojo de pirogalol.

Sin embargo, el ensayo indirecto de la capacidad antioxidante (ORAC) presenta muchas reacciones involucradas que en algunos casos conducen a diferentes conclusiones. Es por esto que se independizó de la molécula sonda y se realizó reacciones directas entre el derivado **1** y el derivado **3** con radicales

peroxilo. Los datos experimentales obtenidos para cinéticas monitoreadas ya sea por medidas de fluorescencia o por medidas de consumo de ambos derivados por HPLC nos condujeron a la obtención de la velocidad máxima de consumo (bajo condiciones de orden cero) tanto para **1** como **3** fue de 0,4 $\mu\text{M}/\text{min}$. Y una estequiometría de 4 moléculas de $\text{ROO}\cdot$ por molécula de compuesto.

Los órdenes de reacción determinados a partir de los datos cinéticos fueron 0,2 y 0,4 para **1** y **3**, respectivamente. Indicando un mecanismo de reacción complejo. Asimismo, el cociente de los valores de constante de velocidad entre ambos derivados permitió establecer que el derivado **1** es más reactivo que **3** frente a los radicales peroxilo. Además, se estableció que la sonda fluoresceína es menos reactiva contra radicales peroxilo en comparación con ambos derivados. Adicionalmente, se descartó la existencia de reacciones en cadena y producción de peróxido de hidrógeno para ambos derivados.

De acuerdo a todos estos resultados, los perfiles cinéticos empleando fluoresceína estarían ligados a una menor reactividad de esta sonda frente a $\text{ROO}\cdot$ en comparación con ambos derivados. Se propone la generación de tetroxido a partir de la reacción de termino entre dos moléculas de radicales peroxilo para luego descomponerse y genera el radical alcóxido $\text{RO}\cdot$. Esta producción es favorecida ya que se libera una molécula estable (O_2).

Por consiguiente, existe una fracción ROO• que reacciona con una fracción de **1** y coexiste otra fracción de ROO• que genera RO• y que reaccionaría con **1** y/o con subproductos de este derivado dando explicación al valor de la estequiometría de reacción.

Los resultados del *scavenging* frente a radicales hidroxilo de todos los derivados en estudio fueron dependientes de los valores de pKa, ya que este experimento tiene un pH de trabajo de 8. Por tanto la fracción de hidroxycumarina en forma aniónica y neutra influencia directamente los valores de actividad antioxidante.

Los cálculos computacionales permitieron establecer los valores para los parámetros PA, Ip y BDE y con esto proponer los mecanismos antioxidantes que son favorecidos termodinámicamente. Estos mecanismos correlacionaron con los valores de pKa y potencial de oxidación de los derivados **1** y **3**.

El estudio de incorporación de los derivados de hidroxycumarina **1** y **3** en modelos de membrana fue determinado en sistema Pampa y liposomas con mayores valores de pseudo constante de reparto para **3** en comparación a **1** (1846 ± 275 , 236 ± 16)

A pesar de tener una diferencia entre estos valores experimentales, ambos derivados están mayoritariamente asociados a estos modelos de membrana. Los modelos de membrana modelados a través de dinámica

molecular correlacionaron con todos los valores experimentales en estos sistemas.

Finalmente, la evaluación de la protección de la sonda DPH a través de la incorporación de **1** o **3** en liposomas fue dependiente del proceso de generación de radicales peroxilo y la rigidez de la membrana de DPPC y DPPC:EF. En cambio, la oxidación de esta sonda en membranas de eritrocitos fue menor al incubar con el derivado **1** *versus* el compuesto **3**. A pesar de esto se debe tomar en cuenta la formación de *orto*-quinona como producto final de **3** que estaría influenciando su actividad antioxidante junto con otros procesos llevados a cabo en membranas reales.

Conclusiones

A partir del desarrollo de esta investigación se concluye lo siguiente:

1.- Los estudios electroquímicos indican para la mayoría de los compuestos una cupla redox irreversible salvo para los derivados 6 y 7. El mecanismo propuesto fue químico electroquímico con la formación del correspondiente radical libre. Los potenciales de los compuestos con grupo catecol resultaron ser menores que los derivados monohidroxilados.

2.- La espectroscopia de resonancia de espín electrónico corrobora el mecanismo propuesto por voltametría cíclica en donde se detectó la presencia de la especie radical y en los casos de las especies con tiempo de vida media corta fue detectada mediante el uso de atrapadores de espín.

3.- La racionalización de los resultados experimentales a través de mecánica cuántica dio una buena correlación entre las constantes de acoplamiento hiperfino y las densidades de espín. Mediante los resultados teóricos se propuso un posible mecanismo de acción antioxidante de las hidroxycumarina estudiadas.

4.- Los estudios de capacidad antioxidante ORAC-fl indicaron que los derivados monohidroxilados presentaron mayor índice ORAC que los compuestos dihidroxilados.

5.- Estudios de ORAC-Py y ORAC-PGR indican una baja reactividad de los derivados frente a radicales peroxilo, siendo estos resultados dependientes de la sonda utilizada. Se propuso que ambos derivados son más reactivos que la sonda fluoresceína explicando los tiempos de inducción. Se descartó la sobreproducción de peróxido de hidrógeno y reacciones en cadena mediante los ensayos FOX y consumo de oxígeno. Por tanto, se demuestra la complejidad del mecanismo de reacción.

6.- La reactividad antioxidante de los derivados de hidroxycumarina frente a radicales hidroxilo a través de la técnica de spin trapping indican la dependencia de esta con los valores de pKa y el número de grupos hidroxilo.

7.- Los valores de pseudo constante de asociación indican que las cumarinas tienen carácter lipofílico lo cual fue corroborado por los ensayos PAMPA y el estudio de dinámica molecular.

8.- El estudio preliminar de la actividad antioxidante en modelos de membrana real fue similar al comportamiento de los derivados medio homogéneo.

Publicación

Parte de esta investigación fue publicada en una revista indexada ISI.

Selected hydroxycoumarins as antioxidants in cells: physicochemical and reactive oxygen species scavenging studies

Fernanda Pérez-Cruz, Frederick A. Villamena, Gerald Zapata-Torres, Amlan Das, Colwyn A. Headley, Elias Quezada, Camilo Lopez-Alarcon y Claudio Olea-Azar. *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, *26* 773–783.

Research Article

*Journal of Physical
Organic Chemistry*

Received: 23 January 2013,

Revised: 9 May 2013,

Accepted: 23 May 2013,

Published online in Wiley Online Library: 26 July 2013

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/poc.3155

Selected hydroxycoumarins as antioxidants in cells: physicochemical and reactive oxygen species scavenging studies

Fernanda Pérez-Cruz^a, Frederick A. Villamena^b, Gerald Zapata-Torres^c, Amlan Das^b, Colwyn A. Headley^b, Elias Quezada^d, Camilo Lopez-Alarcon^e and Claudio Olea-Azar^{a,*}

Participación en congresos durante el programa de doctorado

Esta investigación fue presentada en los siguientes congresos:

I symposium SFRBM South American Group, Free Radicals and Antioxidant in Chile, Diciembre 2010

Spectroscopic characterization and antioxidant capacity assess of new Coumarin derivatives through electronic paramagnetic resonance and ORAC-FI methodology

Pérez-Cruz Fernanda, E. Sobarzo-Sanchez, C. López-Alarcón, C. Olea-Azar

VII MEETING OF THE SFRBM-SOUTH AMERICAN GROUP, Sao Pedro, Brasil, 17- 21 de agosto, 2011.

Antioxidant studies of new synthetic coumarins and chalcones derivatives.

Olea-azar Claudio, **Pérez-cruz Fernanda**, Herrera Alejandra, Matos María João, Vazquez-Rodriguez Saleta, Eugenio Uriarte, Santana Lourdes.

Antioxidant reactivity of new coumarin derivatives.

Pérez-Cruz Fernanda, E. Sobarzo-Sanchez, C. López-Alarcón, C. Olea-Azar.

Becas adjudicadas durante el programa de doctorado

- Beca doctorado nacional CONICYT/Chile 2009-2013.
- Beca Mecesus proyecto UCH-0601 para pasantía doctoral realizada en Universidad de Santiago de Compostela, España bajo la dirección de Eugenio Uriarte Ph.D., 2010.
- Beca para la realización de tesis doctoral CONICYT/Chile 2011-2012.
- Beca Fulbright para pasantía doctoral realizada en Ohio State University Medical Center, Hearsh and Lung Institute, bajo la dirección de Frederick Villamena Ph.D., 2011.
- Becas Chile para pasantía doctoral realizada en Ohio State University Medical Center, Hearsh and Lung Institute, bajo la dirección de Frederick Villamena Ph.D., 2011.
- Beca para asistir a congresos y reuniones internacionales, 2012.

Referencias

1. Felter SP, Vassallo JD, Carlton BD, Daston GP: **A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics.** *Food and Chemical Toxicology* 2006, **44**(4):462-475.
2. Hoult JRS, Payá M: **Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential.** *General Pharmacology: The Vascular System* 1996, **27**(4):713-722.
3. Upadhyay PK, Kumar P: **A novel synthesis of coumarins employing triphenyl(α -carboxymethylene)phosphorane imidazolide as a C-2 synthon.** *Tetrahedron Letters* 2009, **50**(2):236-238.
4. Chakthong S, Weaaryee P, Puangphet P, Mahabusarakam W, Plodpai P, Voravuthikunchai SP, Kanjana-Opas A: **Alkaloid and coumarins from the green fruits of *Aegle marmelos*.** *Phytochemistry* 2012, **75**(0):108-113.
5. Kai K, Shimizu B-i, Mizutani M, Watanabe K, Sakata K: **Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*.** *Phytochemistry* 2006, **67**(4):379-386.
6. Sebastian S, Sylvestre S, Jayarajan D, Amalanathan M, Oudayakumar K, Gnanapoongothai T, Jayavarthanam T: **Molecular structure, Normal Coordinate Analysis, harmonic vibrational frequencies, Natural Bond Orbital, TD-DFT calculations and biological activity analysis of antioxidant drug 7-hydroxycoumarin.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2013, **101**(0):370-381.
7. Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF: **A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009, **33**(5):421-426.
8. Toyama DO, Marangoni S, Diz-Filho EBS, Oliveira SCB, Toyama MH: **Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom.** *Toxicon* 2009, **53**(4):417-426.

9. Vasconcelos JF, Teixeira MM, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Nunes XP, Giulietti AM, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP: **Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation.** *European Journal of Pharmacology* 2009, **609**(1–3):126-131.
10. Kabeya LM, Fuzissaki CN, Taleb-Contini SH, da C. Ferreira AM, Naal Z, Santos EOL, Figueiredo-Rinhel ASG, Azzolini AECS, Vermelho RB, Malvezzi A *et al*: **7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils.** *Chemico-Biological Interactions* 2013, **206**(1):63-75.
11. Hemshekhar M, Sunitha K, Thushara RM, Sebastin Santhosh M, Shanmuga Sundaram M, Kemparaju K, Girish KS: **Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative.** *Biochimie* 2013, **95**(6):1326-1335.
12. Mladenović M, Mihailović M, Bogojević D, Vuković N, Sukdolak S, Matić S, Nićiforović N, Mihailović V, Mašković P, Vrvić MM *et al*: **Biochemical and pharmacological evaluation of 4-hydroxychromen-2-ones bearing polar C-3 substituents as anticoagulants.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012, **54**(0):144-158.
13. Serra S, Ferino G, Matos MJ, Vázquez-Rodríguez S, Delogu G, Viña D, Cadoni E, Santana L, Uriarte E: **Hydroxycoumarins as selective MAO-B inhibitors.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012, **22**(1):258-261.
14. Shih JC, Chen K, Ridd MJ: **Monoamine oxidase: from genes to behavior.** *Annual review of neuroscience* 1999, **22**:197-217.
15. Mao W-w, Wang T-t, Zeng H-p, Wang Z-y, Chen J-p, Shen J-g: **Synthesis and evaluation of novel substituted 5-hydroxycoumarin and pyranocoumarin derivatives exhibiting significant antiproliferative activity against breast cancer cell lines.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, **19**(16):4570-4573.
16. Riveiro ME, Vazquez R, Moglioni A, Gomez N, Baldi A, Davio C, Shayo C: **Biochemical mechanisms underlying the pro-apoptotic activity of 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin in human leukemic cells.** *Biochemical Pharmacology* 2008, **75**(3):725-736.

17. Thati B, Noble A, Creaven BS, Walsh M, McCann M, Devereux M, Kavanagh K, Egan DA: **Role of cell cycle events and apoptosis in mediating the anti-cancer activity of a silver(I) complex of 4-hydroxy-3-nitro-coumarin-bis(phenanthroline) in human malignant cancer cells.** *European Journal of Pharmacology* 2009, **602**(2–3):203-214.
18. Maresca A, Scozzafava A, Supuran CT: **7,8-Disubstituted- but not 6,7-disubstituted coumarins selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II in the low nanomolar/subnanomolar range.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, **20**(24):7255-7258.
19. Maresca A, Supuran CT: **Coumarins incorporating hydroxy- and chloro-moieties selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, **20**(15):4511-4514.
20. Ramesh B, Viswanathan P, Pugalendi KV: **Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats.** *European Journal of Pharmacology* 2007, **566**(1–3):231-239.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC: **Free Radicals in Biology and Medicine:** Oxford University Press, Incorporated; 2007.
22. Schnitzer E, Pinchuk I, Lichtenberg D: **Peroxidation of liposomal lipids.** *European biophysics journal : EBJ* 2007, **36**(4-5):499-515.
23. Carvajal AK, Rustad T, Mozuraityte R, Storrø I: **Kinetic Studies of Lipid Oxidation Induced by Hemoglobin Measured by Consumption of Dissolved Oxygen in a Liposome Model System.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, **57**(17):7826-7833.
24. Çimen MYB: **Free radical metabolism in human erythrocytes.** *Clinica Chimica Acta* 2008, **390**(1–2):1-11.
25. Bland J: **Biochemical consequences of lipid peroxidation.** *Journal of Chemical Education* 1978, **55**(3):151.
26. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B: **Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 2007, **47**:143-183.

27. Poljsak B, uput D, Milisav I: **Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, **2013**:11.
28. Gaspar A, Garrido EM, Esteves M, Quezada E, Milhazes N, Garrido J, Borges F: **New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, **44**(5):2092-2099.
29. Kancheva VD: **Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study.** *European Journal of Lipid Science and Technology* 2009, **111**(11):1072-1089.
30. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002, **13**(10):572-584.
31. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F: **Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes.** *Free Radical Biology and Medicine* 1995, **19**(4):481-486.
32. Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G: **Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure–Activity Relationship†.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, **44**(2):497-501.
33. Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG, Oteiza PI: **Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure.** *Free Radical Biology and Medicine* 2003, **34**(1):84-92.
34. Kandaswami C, Middleton E, Jr.: **Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids.** In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine.* 1994, **366**: 351-376.
35. Fabris S, Momo F, Ravagnan G, Stevanato R: **Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes.** *Biophysical Chemistry* 2008, **135**(1–3):76-83.
36. Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK: **Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects.** *International Journal of Biological Macromolecules* 2007, **41**(1):42-48.

37. Avellone G, Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia M, Turco Liveri V: **Spectrophotometric investigation of the binding of vitamin E to water-containing reversed micelles.** *International Journal of Pharmaceutics* 2002, **234**(1–2):249-255.
38. Rodríguez SA, Nazareno MA, Baumgartner MT: **Effect of different C3-aryl substituents on the antioxidant activity of 4-hydroxycoumarin derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011, **19**(21):6233-6238.
39. Bailly F, Maurin C, Teissier E, Vezin H, Cotelle P: **Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004, **12**(21):5611-5618.
40. Stanchev S, Hadjimitova V, Traykov T, Boyanov T, Manolov I: **Investigation of the antioxidant properties of some new 4-hydroxycoumarin derivatives.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, **44**(7):3077-3082.
41. Šarkanj B, Molnar M, Čačić M, Gille L: **4-Methyl-7-hydroxycoumarin antifungal and antioxidant activity enhancement by substitution with thiosemicarbazide and thiazolidinone moieties.** *Food Chemistry* 2013, **139**(1–4):488-495.
42. Paya M, Halliwell B, Hoult JR: **Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals.** *Biochem Pharmacol* 1992, **44**(2):205-214.
43. Beillerot A, Dominguez JC, Kirsch G, Bagrel D: **Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin.** *Bioorg Med Chem Lett* 2008, **18**(3):1102-1105.
44. Gacche RN, Jadhav SG: **Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Selected Coumarin Derivatives: Preliminary Results of a Structure–Activity Relationship Study Using Computational Tools.** *Journal of Experimental & Clinical Medicine* 2012, **4**(3):165-169.
45. Ramalingam R, Vaiyapuri M: **Effects of umbelliferone on lipid peroxidation and antioxidant status in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma.** *Journal of Acute Medicine* 2013, **3**(3):73-82.
46. Zhang H-YaW, Lan-Fen: **Theoretical elucidation of structure–activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical.** *Journal of molecular structure* 2004, **673**(1-3):199-202.

47. Kalyanaraman B: **Characterization of o-semiquinone radicals in biological systems.** In: *Methods in Enzymology*. 1990,**186**: 333-343.
48. Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA, Guardiola F: **Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance.** *Analytical Biochemistry* 2008, **377**(1):1-15.
49. Yoshimura Y, Inomata T, Nakazawa H, Kubo H, Yamaguchi F, Ariga T: **Evaluation of Free Radical Scavenging Activities of Antioxidants with an H₂O₂/NaOH/DMSO System by Electron Spin Resonance.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, **47**(11):4653-4656.
50. GAUSSIAN98 RA, G. W. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998. In.
51. Becke AD: **Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior.** *Physical Review A* 1988, **38**(6):3098-3100.
52. Rösch N: **Dichtefunktional–Theorie: “Density Functional Methods in Chemistry”.** Hrsg. von J. K. Labanowski und J. W. Andzelm, Springer–Verlag, New York 1991, 443 Seiten, 68 Abb., geb. DM 128,—. ISBN 3–540–97512–8. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* 1991, **39**(11):1312-1313.
53. D'Amore M, Improta R, Barone V: **Conformational Behavior and Magnetic Properties of a Nitroxide Amino Acid Derivative in Vacuo and in Aqueous Solution.** *The Journal of Physical Chemistry A* 2003, **107**(32):6264-6269.

54. Cave RJ, Burke K, Castner EW: **Theoretical Investigation of the Ground and Excited States of Coumarin 151 and Coumarin 120.** *The Journal of Physical Chemistry A* 2002, **106**(40):9294-9305.
55. Lee C, Yang W, Parr RG: **Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density.** *Physical Review B* 1988, **37**(2):785-789.
56. Villamena FA, Liu Y, Zweier JL: **Superoxide Radical Anion Adduct of 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide. 4. Conformational Effects on the EPR Hyperfine Splitting Constants.** *The Journal of Physical Chemistry A* 2008, **112**(49):12607-12615.
57. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F: **Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint.** *Chemical Reviews* 1988, **88**(6):899-926.
58. Scott AP, Radom L: **Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Møller-Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors.** *The Journal of Physical Chemistry* 1996, **100**(41):16502-16513.
59. Velkov Z, Balabanova E, Tadjer A: **Radical scavenging activity prediction of o-coumaric acid thioamide.** *Journal of Molecular Structure*. 2007, **821**(1-3):133-138.
60. Nenadis N, Sigalas MP: **A DFT study on the radical scavenging potential of selected natural 3',4'-dihydroxy aurones.** *Food Research International* 2011, **44**(1):114-120.
61. Prades R, Guerrero S, Araya E, Molina C, Salas E, Zurita E, Selva J, Egea G, López-Iglesias C, Teixidó M *et al.*: **Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor.** *Biomaterials* 2012, **33**(29):7194-7205.
62. Szoka F, Jr., Papahadjopoulos D: **Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes).** *Annual review of biophysics and bioengineering* 1980, **9**:467-508.
63. Ren J, Li Z, Wong F-S: **A new method for the prediction of pore size distribution and MWCO of ultrafiltration membranes.** *Journal of Membrane Science* 2006, **279**(1-2):558-569.

64. Mayer LD, St-Onge G: **Determination of Free and Liposome-Associated Doxorubicin and Vincristine Levels in Plasma under Equilibrium Conditions Employing Ultrafiltration Techniques.** *Analytical Biochemistry* 1995, **232**(2):149-157.
65. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC: **GROMACS: Fast, flexible, and free.** *Journal of Computational Chemistry* 2005, **26**(16):1701-1718.
66. Lindahl E, Hess B, van der Spoel D: **GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis.** *J Mol Model* 2001, **7**(8):306-317.
67. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R: **GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation.** *Computer Physics Communications* 1995, **91**(1-3):43-56.
68. Humphrey W, Dalke A, Schulten K: **VMD: Visual molecular dynamics.** *Journal of Molecular Graphics* 1996, **14**(1):33-38.
69. Lúcio M, Ferreira H, Lima JLFC, Reis S: **Use of liposomes to evaluate the role of membrane interactions on antioxidant activity.** *Analytica Chimica Acta* 2007, **597**(1):163-170.
70. Simić A, Manojlović, Dragan, Šegan D, Todorović, Marija: **Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics.** *Molecules* 2007, **10**(12):2327-2340.
71. Jørgensen LV, Cornett C, Justesen U, Skibsted LH, Dragsted LO: **Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring.** *Free Radical Research* 1998, **29**(4):339-350.
72. Chevion S, Roberts MA, Chevion M: **The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity.** *Free Radical Biology and Medicine* 2000, **28**(6):860-870.
73. Hotta H, Ueda M, Nagano S, Tsujino Y, Koyama J, Osakai T: **Mechanistic Study of the Oxidation of Caffeic Acid by Digital Simulation of Cyclic Voltammograms.** *Analytical Biochemistry* 2002, **303**(1):66-72.

74. Richard S. Nicholson IS: **Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems.** *Analytical Chemistry*, 1964, **36**(4): 706-723.
75. Petrucci R, Saso L, Kumar V, Prasad AK, Malhotra SV, Parmar VS, Marrosu G: **A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (DHMC) and some related compounds in aprotic medium.** *Biochimie* 2010, **92**(9):1123-1129.
76. Kubow S, Janzen EG, Bray TM: **Spin-trapping of free radicals formed during in vitro and in vivo metabolism of 3-methylindole.** *Journal of Biological Chemistry* 1984, **259**(7):4447-4451.
77. Le Nest G, Caille O, Woudstra M, Roche S, Burlat B, Belle V, Guigliarelli B, Lexa D: **Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: II Electrochemical and EPR studies.** *Inorganica Chimica Acta* 2004, **357**(7):2027-2037.
78. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL: **Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, **49**(10):4619-4626.
79. Bortolomeazzi R, Sebastianutto N, Toniolo R, Pizzariello A: **Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential.** *Food Chemistry* 2007, **100**(4):1481-1489.
80. Abou Samra M, Chedea VS, Economou A, Calokerinos A, Kefalas P: **Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry.** *Food Chemistry* 2011, **125**(2):622-629.
81. Piljac-Žegarac J, Valek L, Stipčević T, Martinez S: **Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions.** *Food Chemistry* 2010, **121**(3):820-825.
82. Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S: **Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay.** *Food Chemistry* 2008, **108**(3):1002-1007.
83. Niki E: **Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo.** *Free Radical Biology and Medicine* 2010, **49**(4):503-515.

84. A. Takadate TM, C. Murata, T. Tanaka, M. Irikura and S.Goya: **Fluorescence Characteristics of Methoxycoumarins as Novel Fluorophores**. *Analytical Sciences* 1995, **11**(1):5.
85. Gil ES, Cout RO: **Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2013, **23**, (3) 542-558.
86. Wu Q, Dewald HD: **Voltammetry of Coumarins**. *Electroanalysis* 2001, **13**(1):45-48.
87. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S: **Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins**. *FEBS Letters* 1985, **187**(1):33-37.
88. Burton GW, Ingold KU: **Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro**. *Journal of the American Chemical Society* 1981, **103**(21):6472-6477.
89. Martin I, Aspee A, Torres P, Lissi E, Lopez-Alarcon C: **Influence of the target molecule on the oxygen radical absorbance capacity index: a comparison between alizarin red- and fluorescein-based methodologies**. *Journal Medicinal Food* 2009, **12**(6):1386-1392.
90. Poblete A, López-Alarcón C, Lissi E, Campos AM: **Oxygen Radical Antioxidant Capacity (Orac) Values Of Herbal Teas Obtained Employing Different Methodologies Can Provide Complementary Data**. *Journal of the Chilean Chemical Society* 2009, **54**:154-157.
91. López-Alarcón C, Aspee A, Lissi E.: **Influence of the Target Molecule on the ORAC Index**. *Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease*. *American Chemical Society*, 2012, **1093**: 417-429.
92. Pino E, Campos AM, Lissi E: **8-Hydroxy-1,3,6-pyrene trisulfonic acid (pyranine) bleaching by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) derived peroxy radicals**. *International Journal of Chemical Kinetics* 2003, **35**(10):525-531.
93. López-Alarcón C, Lissi E: **Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities**. *Free Radical Research* 2005, **39**(7):729-736.

94. Niki E: **Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals.** *Methods in Enzymology*. 1990: **186**, 100-108.
95. López-Alarcón C, Aspée A, Lissi E: **Competitive kinetics in free radical reactions of cinnamic acid derivatives. Influence of phenoxyl radicals reactions.** *Free Radical Research* 2007, **41**(10):1189-1194.
96. Valgimigli L, Amorati R, Fumo MG, DiLabio GA, Pedulli GF, Ingold KU, Pratt DA: **The Unusual Reaction of Semiquinone Radicals with Molecular Oxygen.** *The Journal of Organic Chemistry* 2008, **73**(5):1830-1841.
97. Atala E, Aspée A, Speisky H, Lissi E, López-Alarcón C: **Antioxidant capacity of phenolic compounds in acidic medium: A pyrogallol red-based ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assay.** *Journal of Food Composition and Analysis* 2013, **32**(2):116-125.
98. Huitink GM, Diehl H: **Methyl calcein blue and other analogues of calcein blue.** *Talanta* 1974, **21**(11):1193-1202.
99. Queiroz AN, Gomes BAQ, Moraes Jr WM, Borges RS: **A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, **44**(4):1644-1649.
100. Vafiadis AP, Bakalbassis EG: **A DFT study on the deprotonation antioxidant mechanistic step of ortho-substituted phenolic cation radicals.** *Chemical Physics* 2005, **316**(1–3):195-204.
101. Najafi M, Zahedi M, Klein E: **DFT/B3LYP study of the solvent effect on the reaction enthalpies of homolytic and heterolytic OH bond cleavage in mono-substituted chromans.** *Computational and Theoretical Chemistry* 2011, **978**(1–3):16-28.
102. Stepanić V, Trošelj KG, Lučić B, Marković Z, Amić D: **Bond dissociation energy as general parameter for flavonoid radical scavenging activity.** *Food Chemistry*, 2013, **141** (2):1562-1570.
103. Momo F, Fabris S, Stevanato R: **Interaction of fluoxetine with phosphatidylcholine liposomes.** *Biophysical Chemistry* 2005, **118**(1):15-21.
104. Castanho MARB, Prieto MJE: **Fluorescence study of the macrolide pentaene antibiotic filipin in aqueous solution and in a model system of membranes.** *European Journal of Biochemistry* 1992, **207**(1):125-134.

105. Santos NC, Prieto M, Castanho MARB: **Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003, **1612**(2):123-135.
106. Marrink SJ, Sok RM, Berendsen HJC: **Free volume properties of a simulated lipid membrane.** *The Journal of Chemical Physics* 1996, **104**(22):9090-9099.
107. Bassolino-Klimas D, Alper HE, Stouch TR: **Mechanism of Solute Diffusion through Lipid Bilayer Membranes by Molecular Dynamics Simulation.** *Journal of the American Chemical Society* 1995, **117**(14):4118-4129.
108. Curtis EM, Hall CK: **Molecular Dynamics Simulations of DPPC Bilayers Using "LIME", a New Coarse-Grained Model.** *The Journal of Physical Chemistry B* 2013, **117**(17):5019-5030.
109. Tsai H-H, Lee J-B, Huang J-M, Juwita R: **A Molecular Dynamics Study of the Structural and Dynamical Properties of Putative Arsenic Substituted Lipid Bilayers.** *International Journal of Molecular Sciences* 2013, **14**(4):7702-7715.
110. Tieleman DP, Marrink SJ, Berendsen HJC: **A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1997, **1331**(3):235-270.
111. Ferreira TM, Coreta-Gomes F, Ollila OHS, Moreno MJ, Vaz WLC, Topgaard D: **Cholesterol and POPC segmental order parameters in lipid membranes: solid state 1H-13C NMR and MD simulation studies.** *Physical Chemistry Chemical Physics* 2013, **15**(6):1976-1989.
112. Mehnert T, Jacob K, Bittman R, Beyer K: **Structure and Lipid Interaction of N-Palmitoylsphingomyelin in Bilayer Membranes as Revealed by 2H-NMR Spectroscopy.** *Biophysical Journal* 2006, **90**(3):939-946.
113. Kaiser RD, London E: **Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth.** *Biochemistry* 1998, **37**(22):8180-8190.

114. Doba T, Burton GW, Ingold KU: **Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1985, **835**(2):298-303.