



*L'essentiel est invisible.
On ne voit qu'avec le cœur.*

Saint-Exupéry

UCH - FC
DOC- W
A398
c.1

**CINÉTICA Y MECANISMOS DE REACCIÓN DE RADICALES
ESTABLES CON SUSTRATOS DE INTERÉS BIOLÓGICO**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Química



Facultad de Ciencias
por

CAROLINA DEL PILAR ALIAGA VIDAL

Agosto, 2000

Director de Tesis: Dr. Eduardo A. Lissi

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

CAROLINA DEL PILAR ALIAGA VIDAL

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 10 de Agosto del 2000.

Director de Tesis

Dr. Eduardo A. Lissi

A handwritten signature in black ink, consisting of several sweeping strokes, positioned above a horizontal dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Jorge Valenzuela (Presidente)

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Valenzuela", positioned above a horizontal dotted line.

Dr. José Santos

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Santos", positioned above a horizontal dotted line.

Dr. Hernán Speisky

A handwritten signature in black ink, appearing to be "H. Speisky", positioned above a horizontal dotted line.

Dr. Francisco Martínez

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "F. Martínez", positioned above a horizontal dotted line.

AGRADECIMIENTOS



Expreso mi más cálido agradecimiento al Dr. Eduardo Lissi por su valiosa formación y por permitirme desarrollar el trabajo de mi tesis Doctoral en su Laboratorio. Hago extensivo mi agradecimiento a las Doctoras Elsa Abuín, María Victoria Encinas, Angélica Rubio, al Dr. Arturo León, a los alumnos y técnicos que constituyen el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica de la USACH por abrirme un espacio en su efervescente grupo de investigación

A la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por su excelencia y libertad para obtener este grado.

A la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile.

A CONICYT y FONDECYT por financiarme y financiar el desarrollo de la presente investigación a través de la Beca de Doctorado otorgada, Proyectos N°298002 y 4990029 para financiar Tesis de Doctorado y Término de Tesis, respectivamente.

Mi particular agradecimiento al Dr. Renato Contreras por su excelente colaboración, atención y espíritu formativo durante el trabajo realizado en conjunto en el estudio teórico incluido en el Segundo Capítulo de esta tesis.

Al Dr. Marcos Caroli, un amigo en quien siempre encuentro un espacio de sensible e interesante conversación. Alguno de los mecanismos de reacción propuestos

en esta tesis es una muestra de su inteligencia y generosidad. Su amistad representa un valioso tesoro para mí.

A la Dra. Ana Denicola por recibirme en su hogar y en su prestigioso grupo de investigación en la Facultad de Química de la Universidad de la República de Uruguay.

A la Dra. Ohara Augusto por el honor de aceptarme a trabajar en su laboratorio. A mi amiga Edlaine Linares todo mi reconocimiento por su ayuda durante el tiempo de mi estadía realizada en la Universidade de São Paulo.

Querida familia, que todos ustedes encuentren aquí la expresión de mi mas profundo agradecimiento por darme cariño y sentimiento de pertenencia.

A mi maravillosa “concentración estacionaria” de amigos, a los que perdí, a los que no supe querer, a los de siempre por enseñarme lo divino, lo esquivo y necesario de las relaciones humanas, sin ustedes imposible renovar mi entusiasmo en momentos de cansancio, a Uds. por quererme a pesar de mí.

A la pequeña Isis por su fiel y silenciosa compañía al momento de escribir este libro.

A mi esposo Mauricio, compañero adorable... un regalo que me ha dado esta vida. A ti dedico la consolidación de este trabajo.

INDICE DE MATERIA

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	6
<i>“Reaccion del radical catiónico derivado del acido 2,2’-azinobis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonico) con hidroperóxidos y aminoácidos. Cinética y mecanismo”.</i>	
1.1. Introducción	6
1.2. Metodología	10
1.3. Resultados y Discusión	12
1.3.1 Hidroperóxidos	
<i>tert</i> -butilhidroperóxido	15
Peróxido de hidrógeno	28
1.3.2. Aminoácidos.....	34
1.3.2.1. Cisteína	36
1.3.2.2. Triptofano	41
1.3.2.3. Tirosina e Histidina	44
1.4 Discusión General	46
1.5 Conclusiones	56

1.6 Referencias	58
CAPITULO II	60
<i>“Evaluación de la capacidad antioxidante de polifenoles”</i>	
2.1.1. Introducción	60
2.1.2. Metodología	62.
Método basado en la decoloración del catión radical derivado del ABTS	
2.1.3. Resultados	66
2.1.4. Discusión	75
2.2.1. Estudio Teórico	82
Análisis global y local del mecanismo de deshidrogenación de polifenoles	
2.2.2. Aspectos energéticos	84
2.2.3. Detalles computacionales	87
2.2.4. Resultados y Discusión	88
2.2.5. Aspectos locales. Escala de labilidad	93
2.2.6. Análisis termodinámico. Estabilidades relativas	97
2.2.7. Discusión General	110
2.3. Conclusiones Generales del Capítulo	113
2.4. Referencias	114
CAPITULO III	114
<i>“Cinética y mecanismo de la reacción de un radical nitróxido (tempol) con un antioxidante fenólico (trolox)”</i>	
3.1. Introducción	115
3.2. Materiales y Método	119

3.3. Resultados 121

3.4. Discusión 125

3.5. Conclusiones 135

2.6. Referencias 136

APENDICE I

I.1. Relación entre los niveles moleculares microscópicos y variables
termodinámicas macroscópicas 138

I.2. Referencias 144

APENDICE II

II.1. Definición de la función de Fukui. 145

II.2. Referencias 150

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Valores para las constantes de velocidad para agua oxigenada y <i>tert</i> -butilhidroperóxido.....	33
Tabla 1.2.	Velocidades iniciales evaluadas para experimentos realizados con y sin presencia de oxígeno (aire), en ambos casos las condiciones iniciales fueron similares: $ABTS^{*+} = 50 \mu M$; $ABTS \cong 90 \mu M$ y $Trp = 64 \mu M$).....	43
Tabla 1.3.	Potenciales de ionización para los aminoácidos empleados. ^{a)} Este valor obtenido se encuentra en acuerdo con datos reportados por P.H. Cannifton [29].....	50
Tabla 1.4.	Resumen de los valores para los ordenes de reacción obtenidos por la ecuación (1.1) ^{a)} El valor de k fue obtenido cuando la concentración es expresado en μM y el tiempo en segundos.....	54
Tabla 1.5.	Parámetros obtenidos para la ecuación (1.9).....	55
Tabla 2.1.1.	Resumen de las medias de caídas en el valor de la absorbancia del radical catión promovida por los distintos compuestos y mezclas complejas evaluadas.....	69
Tabla 2.1.2.	Los valores ERR y ERT fueron calculados utilizando las expresiones 2.1.1-2.1.4 y representan la equivalencia en Trolox. Para los vinos, el número dado corresponde a la concentración mM de Trolox que produce el mismo efecto que la muestra de vino.....	70
Tabla 2.1.3.	Velocidades de consumo del radical catión para los polifenoles. Estas son obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos $[ABTS^{*+}] (\mu M)$ vs. Tiempo (s)	74
Tabla 2.2.1	Funciones de Fukui regionales y blanduras locales para los estados fundamentales (MH_n) de Acido Gálico (III) y Acido Caféico (IV).....	91

Tabla 2.2.2	Funciones de Fukui regionales y blanduras locales para los estados fundamentales (MXn) de Catequina (V) y Quercetina (VI) y Rutina (VII).....	92
Tabla 2.2.3	Funciones termodinámicas estándares de formación para Acido Gálico (III), Acido Caféico (IV) y sus productos intermediarios en procesos de deshidrogenación sucesiva.....	102
Tabla 2.2.4	Funciones termodinámicas estándares de formación para Catequina (III), Quercetina (VI) y Rutina (VII) y sus productos intermediarios en procesos de deshidrogenación sucesiva.....	103
Tabla 2.2.5.	Funciones de Fukui regionales y blanduras locales para los estados fundamentales de la estructura propuesta en la Figura 2.2.2.....	107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1. Cambios en el espectro UV-visible del ABTS en el tiempo inducido por 10 μM de Triptofano a pH 7. El consumo del radical se sigue a los 734 nm y a los 340 nm regeneración del ABTS..... 13

Figura 1.1.2. Comparación de los métodos para formar $\text{ABTS}^{\bullet+}$ sobre la velocidad de consumo del radical inducido por Cys. Pendiente = 0.974, R = 0.9978..... 14

Figura 1.1.3. (—) Espectro inicial de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ antes de agregar *tert*-butilhidroperóxido; (—) espectro de los productos de la reacción (420 nm) y ABTS formado (340 nm)..... 15

Figura 1.1.4. Correlación entre la velocidad experimental y calculada con los parámetros ajustados de la ecuación (1.1.1) para la reacción entre el radical catión y H_2O_2 17

Figura 1.1.5. Consumo del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ evaluado a los 734 nm ($\epsilon=0.015$), Inducido por la adición de 90 mM de *t*-BuOOH (●) y formación de ABTS, aumento de la banda a los 340 nm ($\epsilon=0.039$) (■)..... 18

Figura 1.1.6. Efecto de pH para la reacción entre *t*-BuOOH y $\text{ABTS}^{\bullet+}$, las concentraciones iniciales fueron: (●) $\text{ABTS}^{\bullet+}$: 30 μM ; ABTS: 10 μM y *t*-BuOOH: 116 mM; (■) $\text{ABTS}^{\bullet+}$: 116 μM ; ABTS: 37 μM y *t*-BuOOH: 116 mM..... 19

Figuras 1.1.7. Ajustes para los mecanismos parciales representados por: **A** ecuación (1.1.7) y **B**: ecuación (1.1.8)..... 23

Figura 1.1.8. Relación entre las velocidades medidas experimentalmente las velocidades calculadas con la Ecuación 1.1.9..... 25

Figura 1.1.9. Datos obtenidos para el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}^{\bullet+}$, graficados de acuerdo a la ecuación 1.1.16. La ordenada permite la estimación de k_{14} ($0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y la pendiente proporciona el valor k_{14}/k_{15} (0.013).. 30

Figura 1.1.10. Efecto de pH en la velocidad inicial de reacción entre ABTS ^{•+} y H ₂ O ₂ . Las concentraciones iniciales fueron: ABTS ^{•+} : 50 μM; ABTS 20 μM y H ₂ O ₂ : 166 mM (■) y 232 mM (●).....	31
Figura 1.2.1. Perfiles obtenidos para la reacción de blanqueamiento del radical ABTS ^{•+} promovido por Cys (□), Trp (○), Tyr (Δ) e His (*), en todos los casos las condiciones empleadas fueron similares [ABTS ^{•+}] ≈ 22 μM; [ABTS] = 50 μM; [aminoácido] = 30 μM; pH = 7.....	35
Figura 1.2.2. Efecto del pH sobre la velocidad de la reacción entre ABTS ^{•+} y Cys. R = 0.996.....	37
Figura 1.2.3. A. Correlación de las velocidades iniciales para el consumo de ABTS ^{•+} por Cys, experimentales y calculadas con los datos obtenidos con la Ecuación 1.2.2 (●) datos obtenidos para ABTS ^{•+} preparado con Persulfato de Potasio y (■) ABTS ^{•+} preparado con MnO ₂ . B. Correlación entre las velocidades iniciales obtenidas en presencia y en ausencia de Oxígeno, R=0.96.....	39
Figura 1.2.3. A. Correlación de las velocidades iniciales para el consumo de ABTS ^{•+} por Cys, experimentales y calculadas con los datos obtenidos con la Ecuación 1.2.2 (●) datos obtenidos para ABTS ^{•+} preparado con Persulfato de Potasio y (■) ABTS ^{•+} preparado con MnO ₂ . B. Correlación entre las velocidades iniciales obtenidas en presencia y en ausencia de Oxígeno, R=0.96.....	40
Figura 1.2.5. Espectros de Fluorescencia para los productos oxidados de Trp, (—) condiciones iniciales: 300 μM Trp, 70 μM ABTS ^{•+} , 80 μM ABTS; (—) Espectro correspondiente a la sustracción del espectro de ABTS formado en la reacción más el inicial (150 μM), λ _{ex.} = 370.....	42
Figura 1.2.6. A. Perfil cinético para la reacción entre Tyr (30 μM) y ABTS ^{•+} (○) disminución de la concentración del radical catión seguida a los 734 nm; (○) aumento de la concentración de ABTS evaluada a los 340 nm. B. Perfil cinético obtenido para el consumo de ABTS ^{•+} inducido por His a pH 7.0. Este perfil corresponde a una compleja conducta cinética con notable período de autoaceleración a tiempos largos de la reacción.....	45

Figura 1.2.8. Correlación entre las velocidades medidas experimentalmente y calculadas. Las velocidades fueron calculadas de acuerdo con la ecuación (1.1.9) y los parámetros de la Tabla 1.2. Datos obtenidos para A: Cys pH 5 (R = 0.99); B: Trp pH 5 (R= 0.97); C: His, pH 7 (R = 0.85).....	53
Figura 2.1.1. Estructura de los polifenoles empleados. I: Trolox, II: L-Tirosina, III: Ácido Gálico, IV: Ácido Caféico, V: Catequina, VI: Quercitina y VII, Rutina.....	63
Figura 2.1.2. Curva de calibración, construida como cambios en la Absorbancia a los 734 nm en función de concentraciones crecientes de Trolox. Los valores indicados son un promedio de 3 determinaciones independientes. Pendiente = 0.02792, n=5, r ² =0.9994.....	65
Figura 2.1.3. Cambios en el espectro del radical catión del ABTS inducido por 2.5 µM de Tirosina. Decrecimiento en las bandas ubicadas a longitudes de onda igual o superiores a los 390 nm (consumo del radical) y aumento de la banda a los 340 nm (formación de ABTS). Inserto: 340 nm (○); 734 nm (◻).....	68
Figura 2.1.4. Disminución de la concentración del radical ABTS ^{•+} después de la adición de 2,5 µM de Trolox (■) y de 2,5 µM Tirosina (●). La [ABTS ^{•+}] es obtenida por la lectura A ₇₃₄ , utilizando un ε= 0.015 µM ⁻¹ cm ⁻¹	71
Figura 2.1.5. Disminución de la concentración del ABTS ^{•+} después de la adición de 2,5 µM de Acido Caféico (◻); de 2,5 µM Ácido Gálico (○); 2,5 µM de Catequina (Δ); 2.5 µM de Quercetina (▽) y 2,5 µM de Rutina (◇). La [ABTS ^{•+}] es obtenida por la lectura A ₇₃₄ , utilizando un ε= 0.015 µM ⁻¹ cm ⁻¹	72
Figura 2.1.6. Disminución de la A ₇₃₄ después de la adición de 10 µl/ml de Vino Blanco (■) y 1 µl/ml Vino Tinto (○).....	73
Figura 2.1.7. Correlación entre los valores ERT y el número de centros reactivos de las respectivas moléculas señaladas en el esquema 2.1. r ² = 0.949, pendiente = 1.025 ±0.106, n=7.....	77
Figura 2.2.1 Numeración empleada para las estructuras analizadas. III: Acido Gálico; IV: ácido Caféico; V: catequina, VI Quercetina y VII: pseudo-Rutina (Quercetina metilada en O8).....	88

Figura 2.2.2. Estructura correspondiente a la Catequina modificada por reordenamiento de H, de acuerdo la estructura VII propuesta en el Esquema 2.2.1.....	106
Figura 3.1. Espectro de EPR correspondiente a 10 μ M de TEMPOL (—) (100%). Intensidad de la señal luego de 30 minutos de agregados 10 mM de Trolox (___) (29% de la señal inicial).....	122
Figura 3.2. Efecto de la adición de DTPA (0.1 mM) en la velocidad de consumo de TEMPOL (10 μ M) inducido por la adición de 10 mM de Trolox a pH 7.0. Experimentos realizados en buffer que no ha sido pre-tratado con Chellex-100. (○) Experimento control sin DTPA. (◻) Experimento realizado en presencia de DTPA.....	123
Figura 3.3. Efecto de la remoción de oxígeno en la velocidad de consumo de TEMPOL (○) Experimento en presencia de aire. (◻) Experimento en solución purgada con nitrógeno. El ajuste corresponde a un decaimiento mono-exponencial.....	124
Figura 3.4. Efecto de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-1-piperinilhidroxilamina (20 μ M) en la reacción de TEMPOL (10 mM) con Trolox (10 mM). (○) Control, sin hidroxilamina; (◻) Experimento en presencia de hidroxilamina.....	131
Figura 3.5. Dependencia de la constante de velocidad pseudo-unimolecular como una función de la concentración de Trolox, medida a concentración fija de TEMPOL (10 μ M), (Δ) 2.5 mM Trolox; (○) 5 mM Trolox; (◻) 10 mM Trolox. En el inserto se muestra la dependencia del log de la constante de velocidad como una función del log de la concentración de Trolox.....	132
Figura 3.6. A. Consumo de Tempol en el tiempo medidos a concentración fija de Trolox (10 mM): (○) 2.0 μ M Tempol; (◻) 10 μ M Tempol; (◻) 10 μ M Tempol. B. dependencia del log de la constante de velocidad como una función del log de la concentración de Tempol.....	133
Figura 3.7. Efecto de metales en la velocidad de reacción entre TEMPOL y Trolox (◻) reacción libre de metales; (Δ) reacción en presencia de 20 μ M de Fe^{3+} ; (○) reacción en presencia de Fe^{2+} /EDTA 1:2.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ABTS	:	Acido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ABTS^{•+}	:	Radical catión derivado del ácido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).
DPTA	:	Acido di-etilentriaminopentaacético
<i>t</i>-BuOOH	:	<i>tert</i> -Butilhidroperóxido.
ROOH	:	Hidroperóxido
XH	:	aminoácido reducido
Trolox	:	Acido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
TEMPOL	:	4-Hidroxi-2,2,6,6,-tetra-metilpiperidin-1-oxilo
EPR	:	Resonancia Paramagnética Electrónica
CAO	:	Capacidad Antioxidante
ERR	:	Equivalentes Reactivos Evaluados en la etapa Rápida
ERT	:	Equivalentes Reactivos Totales.
ΔA	:	Delta de Absorbancia
DFT	:	Teoría de Funcionales de la Densidad
<i>f</i>(r)	:	Función de Fukui.
<i>S</i>	:	Blandura global
<i>s</i>(k)	:	Blandura local
μ	:	Potencial Químico Electrónico
η	:	Dureza global
MHn	:	Polifenol reducido

RESUMEN

El radical catiónico derivado del ácido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) ha sido ampliamente utilizado como método para evaluar tanto la presencia como la capacidad antioxidante en sistemas biológicos. De la misma manera se utiliza en la evaluación de la capacidad antioxidante de compuestos puros o mezclas complejas de éstos. En esta tesis se presenta un estudio cinético de las reacciones de este radical con una serie de aminoácidos e hidroperóxidos. Se determinó que estos últimos son capaces de blanquear la solución fuertemente coloreada del radical catión, resultado que muestra que el agua oxigenada puede interferir en la interpretación de los resultados cuándo ésta es utilizada en el método de producción del radical. Los resultados con los aminoácidos e hidroperóxidos son explicados en términos de un mecanismo simple, descrito por un paso inicial parcialmente reversible que compromete un proceso de transferencia electrónica desde el sustrato hacia el radical. Este paso es inhibido por la concentración de ABTS y de protones. La ley cinética depende de las reacciones secundarias (reacciones de terminación). A pesar de la simplicidad del mecanismo, la ley de velocidad es compleja, lo que impide determinar las constantes de velocidad exactas para todos los pasos elementales del proceso.

Se evaluaron las capacidades antioxidantes de una serie de polifenoles y mezclas complejas de éstos, utilizando el método de blanqueamiento del radical derivado catiónico del ABTS expresado en términos de equivalentes de Trolox. En esta oportunidad el método de preparación para producir el radical catiónico utiliza MnO_2 , que deja al sistema libre de interferentes. En este estudio se presentan dos índices, el primero de ellos, evaluado a tiempos cortos de la reacción (ERR), es relacionado con el número de centros más reactivos de la molécula y el segundo evaluado a tiempos largos (ERT), se relaciona con la capacidad antioxidante total. A fin de racionalizar el mecanismo de deshidrogenaciones consecutivas propuesta, se realizó un estudio teórico que evalúa las propiedades locales y globales de cada molécula, utilizando los índices de reactividad que proporciona la Teoría de Funcionales de la Densidad. La magnitud de las funciones de Fukui evaluada sobre los Oxígenos a los cuales están unidos los Hidrógenos potencialmente reactivos, permiten identificar, los centros con mayor susceptibilidad de transferir sus hidrógenos en cada una molécula. Estos índices son relacionados con la reactividad y el costo energético asociado a los procesos de deshidrogenación. Los resultados teóricos finalmente son relacionados con los índices experimentales ERR y ERT con las funciones de Fukui radicalarias locales (f_k) o globales (S), que describen a los sistemas estudiados. Se ha podido establecer al menos una conexión cualitativa entre los resultados experimentales y teóricos: por un lado la información de reactividad que provee el índice ERR y por otro, la información termodinámica que contiene el índice ERT.

También se ha estudiado la reacción entre 4-Hidroxi-2,2,6,6,-tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPOL) y el ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). La cinética de esta reacción estudiada por el decaimiento de la señal de EPR del nitróxido fue racionalizado en términos de una reacción bi-molecular de transferencia electrónica. La presencia de metales en el medio de reacción también fue evaluada.

ABSTRACT

The radical cation derived from the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) has been widely used in the evaluation of the antioxidant potential in biological systems. This chemical has been also used for evaluating antioxidant potential of pure compounds and complex mixtures of them. In this thesis, a kinetic study on the reactions of this radical against a series of amino acids and hydroperoxides is presented. Hydroperoxides have the ability of bleaching a strongly colored solution of the radical cation. This result suggests that the presence of hydrogen peroxide may alter the interpretation of experiments, when it is used as radical generator in the initiation step. The results of the reactions of aminoacids and hydroperoxides may be described on the basis of a simple mechanism characterized by an initial reversible step that involves an electron transfer process from the substrate to the radical cation. This step may be inhibited by increasing ABTS and proton concentrations. The kinetic law depends upon secondary (termination step) reactions. Despite the simplicity of the proposed mechanism, the rate law is complex, precluding the determination of accurate rate constants for the elementary steps involved in the whole process. The antioxidant potential of a series of polyphenols and complex mixtures of them were evaluated using the bleaching technique of ABTS radical cation. The antioxidant potential was measured

in terms of Trolox equivalents. The generation step of the radical cation uses MnO_2 in the initiation step, so that the system becomes free of any interfering species. Two indexes describing the antioxidant potential were introduced: the first one ERR, evaluated in short terms assays is related to the number of active centers in the molecules. The second one ERT, measures the total antioxidant potential.

In order to rationalize the proposed mechanism of dehydrogenation of polyphenols, a theoretical study framed on global and local reactivity indexes, defined in the context of density functional theory was performed. Radical Fukui functions and radical local softness provide useful information about the most active centers in a molecule towards dehydrogenation reactions. They are mostly related to the kinetic control products and are expected to display at least, a qualitative relationship with the ERR empirical index. The global and local reactivity analysis were complemented with a thermochemical study on the relative stability of the different intermediate species generated in the dehydrogenation processes. While the theoretical local and global indexes show a qualitative relationship with the empirical ERR index, the theoretical analysis incorporating the thermodynamics aspects are also consistent with the information encompassed in the ERT index.

An additional kinetic study of the reaction between TEMPOL and Trolox was also performed, using the EPR signal decay of the nitroxide. The reaction mechanism was rationalized in terms of a bimolecular electron transfer and the presence of metals also was evaluated.

INTRODUCCION

Aunque los radicales libres de larga vida (o “estables”) se caracterizan por tener una constante de velocidad de auto-reacción muy baja y los procesos de equilibrio de dimerización y/o de transferencia electrónica están desplazados favoreciendo la formación del radical [1], ellos pueden entrar en reacciones bimoleculares con sustratos altamente reactivos [2-5].

Las reacciones de radicales libres han sido empleadas en la evaluación de capacidades antioxidantes de compuestos puros [6-12] y para la evaluación de la capacidad antioxidante de mezclas complejas tales como, extractos vegetales [13-16] y fluidos biológicos [17-22]. Sin embargo, para el interés de entender qué se está midiendo en esos experimentos es necesario determinar el mecanismo de la reacción entre el radical libre y los sustratos empleados, así como los factores que determinan la cinética y estequiometría del proceso. De esta manera se ha propuesto como objetivo general de esta tesis estudiar la cinética y postular el mecanismo de reacción entre el radical cationico derivado del ácido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y una serie de sustratos que tienen un hidrógeno lábil en su estructura. Este radical ha sido ampliamente utilizado como ensayo colorimétrico para la evaluación de capacidad

antioxidante. Entre los diversos métodos usados para generar el radical, uno de los más empleados está basado en un sistema enzimático que emplea agua oxigenada como oxidante [23]. Dada la presencia de un hidrógeno relativamente lábil en este tipo de compuestos, se ha propuesto como hipótesis de trabajo una posible interacción entre el radical catiónico e hidroperóxidos, los que podrían intervenir en el proceso de blanqueamiento del radical, interfiriendo de esta manera en la interpretación de los resultados. Así mismo, en otras metodologías propuestas para la preparación del radical catión [24], los ensayos se realizan a un tiempo fijo. Esto deja sin conocer qué ocurre con la reactividad de los compuestos a tiempos tempranos de reacción [25]. En el primer Capítulo de esta tesis se presenta el estudio cinético y se postula un mecanismo para las reacciones entre el radical catión derivado del ABTS con dos hidroperóxidos y una serie de aminoácidos.

En el Segundo Capítulo se presentan las capacidades antioxidantes, evaluadas a partir del consumo del radical catiónico derivado del ABTS y referido a un estándar (Trolox), para una serie de polifenoles y de mezclas complejas de ellos. En este estudio se discuten la interpretación de dos índices de capacidad antioxidante, obtenidos a tiempos cortos y largos de la reacción. Además se presenta un estudio teórico que intenta racionalizar los aspectos estructurales y energéticos del mecanismo de deshidrogenación propuesto con los índices de reactividad que proporciona la Teoría de Funcionales de la Densidad.

Con el objeto de establecer diferencias y/o similitudes con el mecanismo postulado en el Primer Capítulo para la reacción entre el radical derivado del ABTS y

los sustratos empleados, en el Tercer Capítulo se presenta un estudio cinético de la reacción entre un radical estable con iguales características como es el TEMPOL y un compuesto fenólico (Trolox). En él se postula un mecanismo de reacción simple que involucra un proceso bi-molecular entre el radical y el sustrato, y se evalúa el efecto de metales en el medio.

REFERENCIAS

1. K.U. Ingold, Rate constant for free Radical Reaction in Solution, in *Free Radicals*, J.K. Kochi, Ed. Wiley, New York, 1973, Vol. I, p.37.
2. E. A. Lissi, M.A. Rubio, D. Araya and G. Zanocco, *Int. J. Chem. Kinet.* **12**, 871 (1980)
3. E. Niki, J. Tsuchiya, Y. Yoshikawa, Y. Yamamoto and Y. Kamiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **59**, 497 (1986).
4. C. Romay, C. Pascual and E. A. Lissi, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 175 (1996).
5. T. Kurechi, K.Kikugawa and T. Kato, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2089 (1980).
6. C. A. Rice-Evans, N.J. Miller, G.P. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, *Free Rad. Res.* **22**, 375 (1995).
7. C. A. Rice-Evans, N.J. Miller and G. Paganga, *Free Rad. Biol. Med.* **20**, 933 (1996).
8. N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg and C. A. Rice-Evans, *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 339 (1995).
9. N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Cadeiras, P.M. Bramley and C. A. Rice-Evans, *FEBS Letters*, **384**, 240 (1996).
10. N.J. Miller, C. Castelluccio, L. Tijburg and C. A. Rice-Evans, *FEBS Letters*, 392, 40 (1996).
11. Y. Kono, H. Shibata, Y. Kodama and Y. Sawa, *Biochem. Journal* **312**, 947 (1995).
12. M. B. Arnao, J.L. Casas, J. A. Del Rio, M. Acosta and F. García-Cánovas, *Anal. Biochem.* **185**, 335 (1990).

13. C. A. Rice-Evans, N.J. Miller, *Brit. Food. J.* **97**, 35 (1995).
14. C. A. Rice-Evans, N.J. Miller, *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 790 (1996).
15. H. Wang, G. Cao and R.L. Prior, *J. Agric. and Food Chem.*, **44**, 701 (1996).
16. T.P. Whitehead, D. Robinson, S. Allaway, J. Syms and A. Hale, *Clin. Chem.*, **41**, 32 (1995).
17. D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold and S. Locke, *FEBS Letters*, **187**, 22 (1985).
18. T.P. Whitehead, G.H.G.Thorpe and S.R.J. Maxwell, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 265 (1992).
19. G. Cao, C.P. Verdon, A.H.B.Wu, H.Wang and R.L. Prior, *Clin. Chem.* **41**, 1738 (1995).
20. A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini and A. Ferrouzzi, *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 29 (1995).
21. N.J. Miller and C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinatham and A. Milner, *Clin. Sci.* **84**, 407 (1993).
22. K. Lonnot, T. Metsa-Ketela, G. Molnar, J-P.Ahonene, M. Latvala, J. Peltola, T. Pietila and H. Alho, *Free Rad. Biol. Med.*, **21**, 211 (1996).
23. M.B. Arnao, A. Cano, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas and M.Acosta, *Anal. Biochem.*, **236**, 255 (1996)
24. N.J. Miller and C.A. Rice-Evans, *Free Rad. Res.* **26**, 195 (1997).
25. R.Re, N. Pelegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C.A. Rice-Evans, *Free. Rad. Biol. Med*, **26**, 1231 (1999)

CAPITULO I

REACCION DEL RADICAL CATIONICO DERIVADO DEL ACIDO 2,2'-AZINOBIS(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFONICO CON HIDROPERÓXIDOS Y AMINOÁCIDOS. CINÉTICA Y MECANISMO.

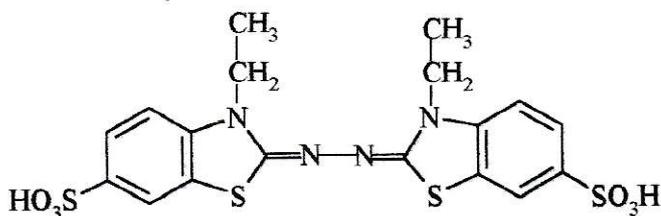
1.1. INTRODUCCION

La capacidad de algunos aditivos altamente reactivos para disminuir la formación del radical estable derivado del ácido 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Esquema 1.1) cuando éste es incubado en presencia de una fuente de radicales libres, ha sido ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos puros y de mezclas complejas [1-7]. La interpretación de los datos en esos sistemas no es directa, ya que la disminución de la concentración del radical catión, que se registra en presencia de los aditivos, se puede deber a la captura de radicales primarios y/o al blanqueamiento del radical catión formado por los aditivos. Esta hipótesis se genera al revisar una de las metodologías más utilizada para evaluar capacidad antioxidante de extractos vegetales y fluidos biológicos [8, 9]. El sistema empleado en estos ensayos es bastante complejo, contiendo agua oxigenada y peroxidasa

de rábano, que conforman el sistema oxidante. La medida se realiza en forma indirecta, pues la acción de los antioxidantes determina la concentración del radical catión derivado del ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) producido y no considera la acción del hidroperóxido sobre el consumo del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ formado. Con respecto a esto, es interesante evaluar en forma directa la capacidad que tienen ciertos compuestos con interés biológico de reaccionar con radicales libres estables y, a fin de entender que es lo que está siendo medido en este tipo de experimentos, es necesario determinar el mecanismo de la reacción entre el radical libre y el sustrato.

Un sistema no acuoso que ha sido bastante estudiado a fin de entender el mecanismo, es el de la reacción entre el radical DPPH y compuestos fenólicos. Estos han demostrado que el mecanismo de la reacción es complejo e involucra una serie de procesos reversibles [10-13], lo que hace difícil interpretación los resultados cinéticos y/o los factores estequiométricos asociados al proceso. Además se han mostrado notables diferencias entre el comportamiento del DPPH y el radical derivado del ABTS [6]

Es interesante entonces conocer cuales compuestos y a que velocidades son capaces de reaccionar con un radical estable como es el radical catión derivado del ABTS. Las ventajas de este radical son su hidrosolubilidad y sus altos coeficientes de extinción a longitudes de onda altas [14]. Esto permite que la evaluación de la velocidad de consumo se puede efectuar con mínimas interferencias. Este radical puede ser además obtenido fácilmente por una oxidación mono-electrónica del ABTS:



Esquema 1.1. Estructura del ABTS

El MnO_2 , persulfato de Potasio, peroxidasa de rábano o cualquier fuente de radicales libres (i.e., un azo compuesto) bajo condiciones aeróbicas pueden ser empleados como oxidantes. El radical resultante es una especie de larga vida, con bandas de absorción características a los 416, 650 y 734 nm. La concentración del radical catiónico puede ser evaluada fácilmente a partir de los coeficientes de extinción a esas longitudes de onda [14].

Se conoce que pequeñas moléculas tales como fenoles, tioles, aminas, ácido úrico y ascórbico son capaces de reducir al catión radical [15,16]. Hasta la fecha ha sido llevado a cabo un estudio cinético completo, empleando con una familia de monofenoles como sustratos [6]. El mecanismo de este proceso fue racionalizado en términos de un pre-equilibrio entre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y el sustrato, un paso que ha sido definido como de transferencia electrónica y dependiente del pH. Las reacciones secundarias de los

radicales del sustrato producidos en este paso definirían los productos finales y determinarían la expresión de la ley cinética.

Ha sido mostrado que proteínas, tales como albúmina o bilirrubina, son capaces también de blanquear una solución con los radicales del ABTS pre-formados [8]. También una serie de aminoácidos han dado respuesta positiva cuando su capacidad antioxidante es evaluada con el método de la formación el radical del ABTS en el sistema H_2O_2 /peroxidasa/ABTS [17]. Sin embargo, no ha sido establecido cuales aminoácidos son los más reactivos, ni ha sido determinada la cinética de la reacción. Así mismo, no se ha determinado ni el mecanismo ni la estequiometría del proceso, lo que constituye uno de los objetivos principales de esta tesis.

En particular, en este trabajo se ha abordado el estudio de la reacción entre los radicales derivados del ABTS con hidroperóxidos (agua oxigenada y *tert*-butilhidroperóxido) a fin de elucidar si éstos intervienen en el blanqueamiento de la solución de los radicales cuando los radicales del ABTS son producidos por el método que utiliza H_2O_2 /peroxidasa/ABTS como sistema oxidante. También se ha escogido una serie de aminoácidos. Los seleccionados tienen un átomo de hidrógeno reactivo en su cadena lateral, al cual le es asociada su reactividad frente a los radicales. Los aminoácidos seleccionados fueron Cisteína (-SH), Triptofano (-NH), Histidina (-NH) y Tirosina (-OH) y las reactividades de estos compuestos fueron comparadas con la observada en los aminoácidos que carecen del H unido al heteroátomo de la función de la cadena lateral característica, como son: N-metil-Triptofano, O-metil-Tirosina y Cistina.

1.2 METODOLOGIA

El radical-catión derivado del ABTS fue preparado en soluciones reguladas a tres pHs diferentes (5, 6 y 7). En todos los casos la concentración de la solución amortiguadora empleada, de sales de fosfato sódico y/o potásico (MERCK) para los pH6 y pH7 y citrato/cítrico para pH5, fue 100 mM. El radical es obtenido por oxidación, en una concentración aproximadamente 150 μM , utilizando MnO_2 en polvo (25 mg/ml) (Sigma) o oxoperóxido sulfato de Potasio (250 mM) (MERCK) como oxidantes. En este último caso la reacción debe ser mantenida durante 2 horas a 50 °C antes de lograr una alta concentración final del radical catión. En el primer caso la oxidación es instantánea y el exceso de sólido es removido por centrifugación y posterior filtración. La solución del radical catión se mantiene en frío antes de su uso y su concentración es estable por varias horas.

Para evaluar el efecto de trazas de metales potencialmente presentes en el medio de reacción, se prepararon soluciones amortiguadas pre-tratadas con el agente quelante, Chellex-100.

La concentración del radical es evaluada midiendo su absorbancia a los 734 nm, y utilizando el coeficiente de extinción molar a esta longitud de onda $\epsilon = 0.015 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A lo largo de la cinética la concentración del compuesto precursor (ABTS) se puede

estimar a partir de su máximo de absorción a los 340 nm, donde presenta un coeficiente de extinción molar, $\varepsilon = 0.039 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Las cinéticas de consumo del radical catión inducida por los compuestos aquí seleccionados fueron seguidas a 23 ± 1 °C en un espectrómetro UV-visible UNICAM o en un Vis Chem Station Hewlett Packard con arreglo de diodos. Este último espectrómetro permitió seguir cinéticas de consumo que ocurren en pocos segundos y, por lo tanto, se pudieron estudiar sustratos de alta reactividad.

Los hidroperóxidos, H_2O_2 y t-butil-hidroperóxido (t-BuOOH) fueron adquiridos en laboratorios MERCK. Los aminoácidos L-Tirosina (Tyr) y L-Triptofano (Trp) fueron MERCK, L-Cisteína (Cys) SIGMA y L-Histidina (His) EASTMAN. Este último compuesto fue purificado previo a su uso por re-cristalización en metanol.

Con el objeto de obtener información cinética, entre los sustratos seleccionados con el radical derivado del ABTS, las velocidades de las reacciones fueron medidas en un amplio rango de condiciones experimentales: $\text{ABTS}^{\bullet+} = 9$ a $60 \mu\text{M}$; $\text{ABTS} = 10$ a $450 \mu\text{M}$; Aminoácidos = $2 \mu\text{M}$ a 0.2 mM ; Hidroperóxidos = 1 a 30 mM . En particular, se determinaron los efectos de pH, concentración inicial de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de ABTS y del sustrato, tanto en la velocidad como en la estequiometría del proceso.

La velocidad inicial de cada proceso fue calculada realizando un ajuste teórico a los perfiles cinéticos obtenidos ($[\text{ABTS}^{\bullet+}]$ vs. tiempo). Para esto se utilizaron funciones mono o bi-exponenciales dependiendo del caso y se calcularon las primeras derivadas de dichas expresiones a $t=0$.

1.3 RESULTADOS y DISCUSION

La adición de concentraciones micro-molares de los aditivos hidropoxidados, agua oxigenada y *tert*-butilhidropérido (*t*-BuOOH), y de soluciones de aminoácidos, blanquean rápidamente la solución del radical catión derivado del ABTS. El proceso fue cuantificado realizando registros en el tiempo de la disminución de la banda ubicada a los 734 nm, para un amplio rango de condiciones experimentales. El efecto del aditivo depende de las condiciones iniciales de pH, concentración del ABTS inicial, de catión radical y del aminoácido o hidropérido empleado. Junto al decrecimiento en la absorbancia asociada al consumo del radical, se observó en todos los casos un concomitante aumento de la banda a los 340 nm, indicativo del aumento de la concentración de ABTS reducido (Figura 1.1.1).

Los resultados obtenidos mostraron ser independientes de la metodología empleada para la preparación del radical (MnO_2 y/o Persulfato de Potasio), Figura 1.1.2. Los registros de las cinéticas efectuadas en soluciones preparadas con Chellex-100 y en ausencia de este quelante, permitió mostrar que las velocidades iniciales son independientes de la presencia de trazas de metales en el medio.

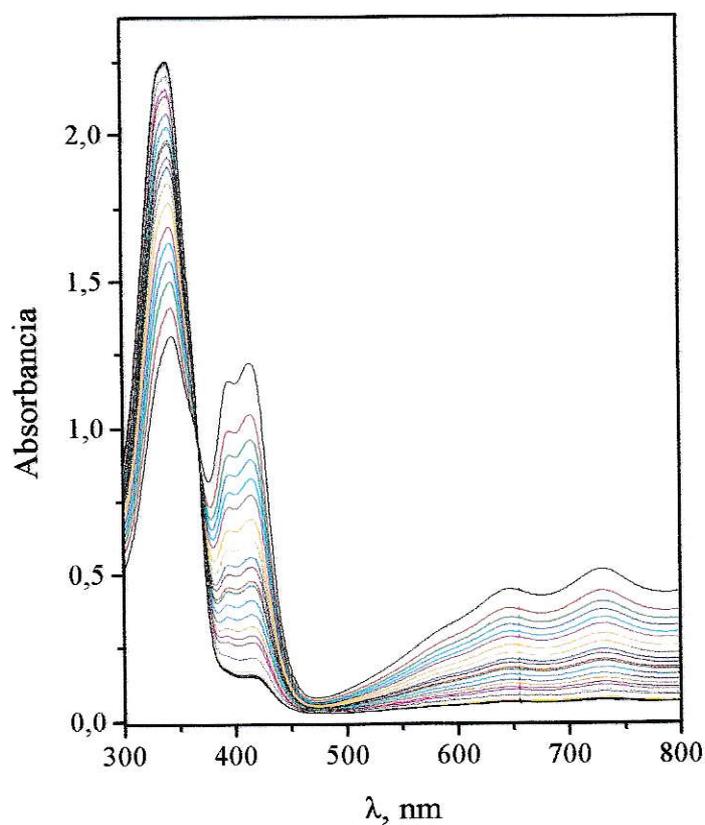


Figura 1.1.1. Cambios en el espectro UV-visible del ABTS en el tiempo inducido por 10 μ M de Triptofano a pH 7. El consumo del radical se sigue a los 734 nm y a los 340 nm regeneración del ABTS.

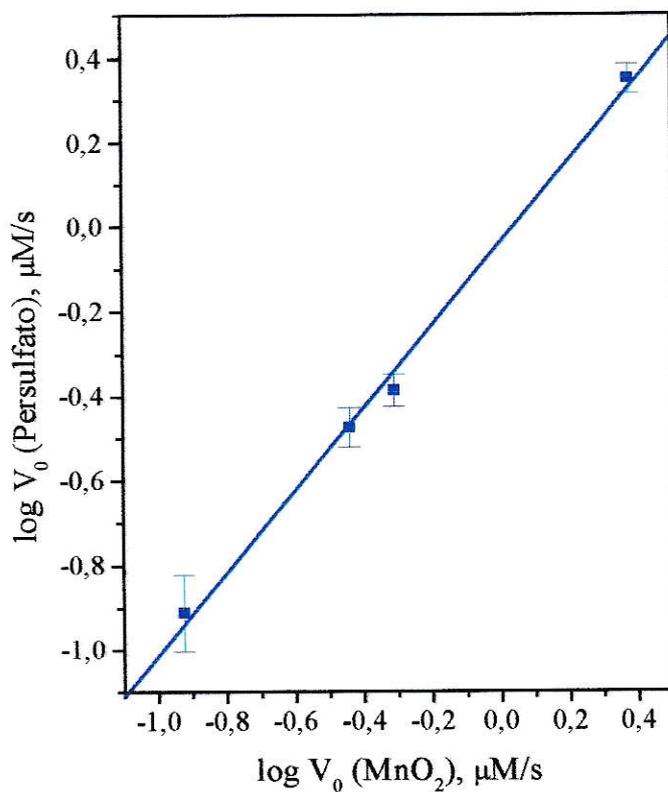


Figura 1.1.2. Comparación de los métodos para formar $\text{ABTS}^{\bullet+}$ sobre la velocidad de consumo del radical inducido por Cys. Pendiente = 0.974, $R = 0.9978$.

1.3.1. Hidroperóxidos

1.3.1.1. *tert*-butilhidroperóxido

El perfil cinético de la reacción entre el radical catiónico del ABTS y *tert*-butilhidroperóxido, muestra que cuando el radical es casi completamente consumido, una pequeña disminución en la absorbancia a los 340 nm, respecto de la inicial y una nueva absorción a los 421 nm Figura 1.1.3 indica la ocurrencia de reacciones secundarias irreversibles que consumen ABTS.

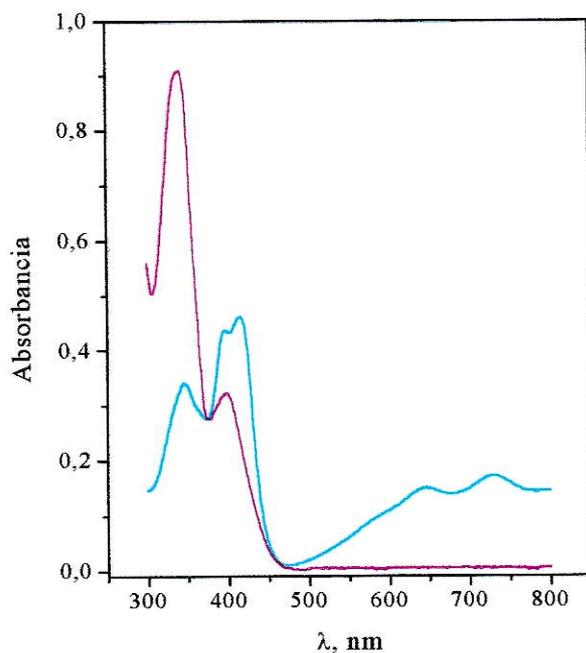


Figura 1.1.3. (—) Espectro inicial de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ antes de agregar *tert*-butilhidroperóxido; (—) espectro de los productos de la reacción (420 nm) y ABTS formado (340 nm).

La velocidad del consumo del radical catión, evaluada a partir de la velocidad de disminución a la A_{734} , es dependiente de las condiciones iniciales.

Los datos, como una primera aproximación, fueron ajustados a una expresión simple de la velocidad de la reacción V , :

$$\log V = \log k + a \log[\text{ABTS}] + b \log[\text{ABTS}^{\bullet+}] + c \log[t - \text{BuOOH}] \quad (1.1.1)$$

En este ajuste se consideró un amplio rango de concentraciones de los componentes: $[\text{ABTS}^{\bullet+}]$ desde 2.0 a 33 μM ; $[\text{ABTS}]$ desde 22.0 a 142.0 μM ; y $t - \text{BuOOH}$ desde 12.0 a 117.0 μM . Para una V expresada en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, los datos ($n=30$), arrojaron los siguientes valores para los coeficientes de la ecuación (1.1.1):

$$k = 1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}; \quad a = -0.638; \quad b = 1.161; \quad c = 0.893$$

con un coeficiente de correlación de 0.956 (Figura 1.1.4). Estos valores indican que ABTS actúa como un inhibidor y permiten ser interpretados en términos de un mecanismo que considera un primer paso reversible. Valores de $b < 2$ y $a > -1$ indicarían que dicha reversibilidad no es completa en este sistema.

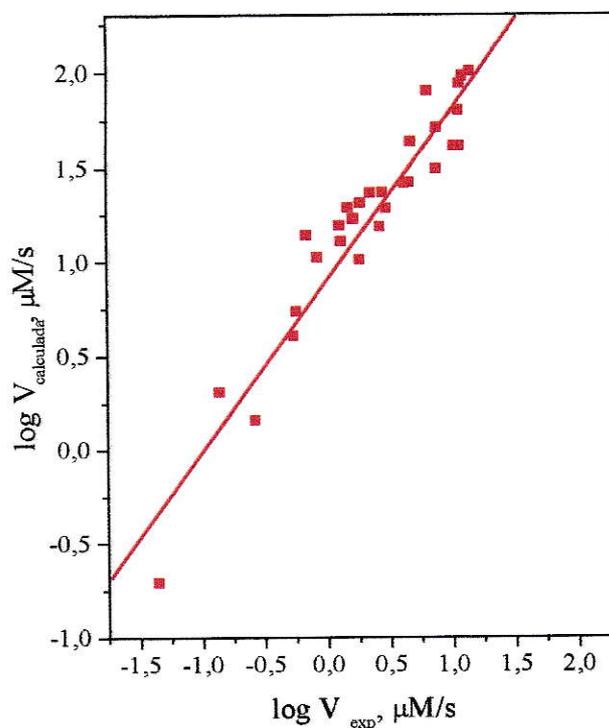
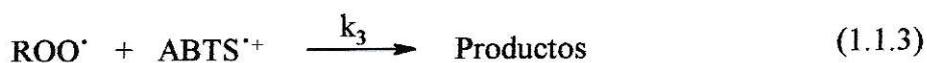


Figura 1.1.4. Correlación entre la velocidad experimental y calculada con los parámetros ajustados de la ecuación (1.1.1) para la reacción entre el radical catión y H₂O₂.

Estos datos pueden ser interpretados por lo tanto en términos del siguiente mecanismo:



Este mecanismo es compatible con una importante transformación de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en ABTS, como se muestra en la Figura 1.1.5.

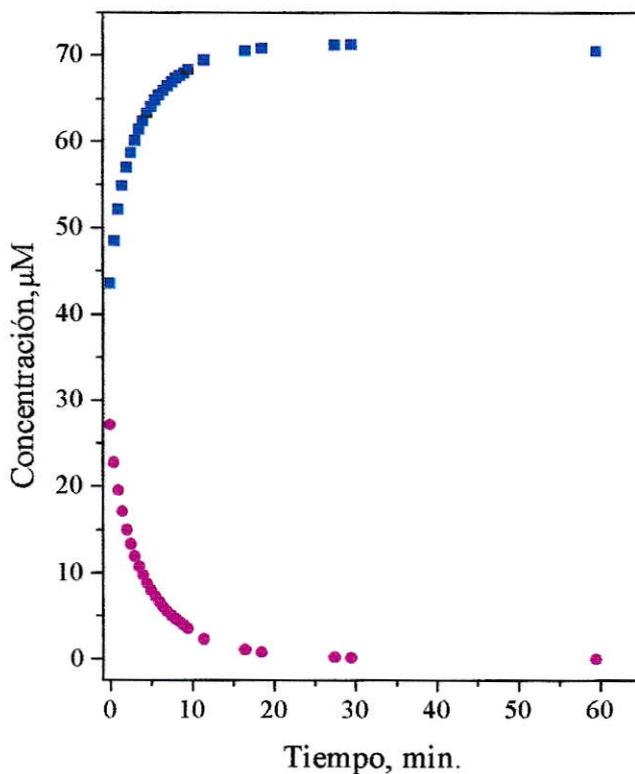


Figura 1.1.5. Consumo del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ evaluado a los 734 nm ($\epsilon=0.015$), inducido por la adición de 90 mM de *t*-BuOOH (●) y formación de ABTS, aumento de la banda a los 340 nm ($\epsilon=0.039$) (■).

El mecanismo propuesto implica que la reacción inversa (-1.1.2) debe ser dependiente del pH. Con el objeto de probar esta dependencia se efectuaron medidas a varios pHs. Los datos obtenidos (figura 1.1.6) muestran que, tal cual como predice el mecanismo propuesto, la reacción es fuertemente inhibida al disminuir el pH de la solución. De hecho, la pendiente del gráfico 1.1.4 es aproximadamente 0.8, indicando que la inhibición por protones es casi de primer orden.

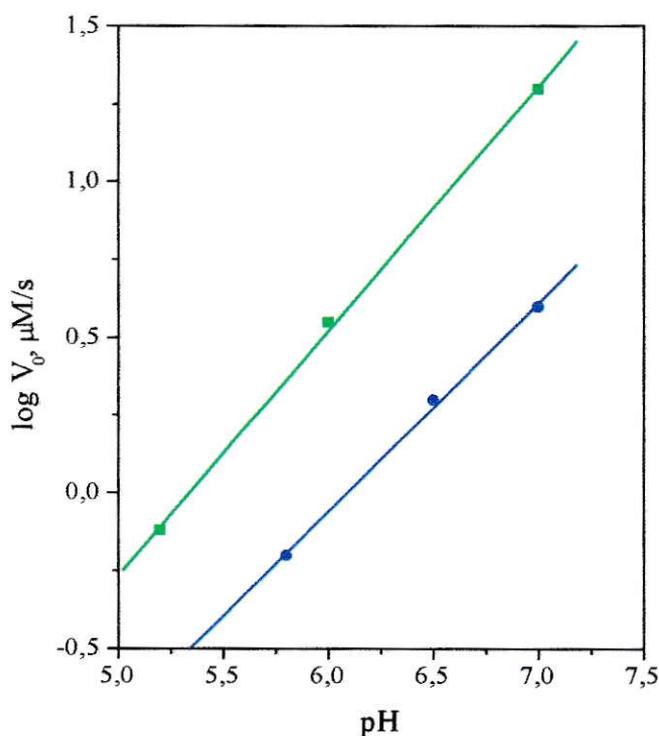


Figura 1.1.6. Efecto de pH para la reacción entre t-BuOOH y ABTS^{*+} , las concentraciones iniciales fueron: (●) ABTS^{*+} : 30 μM ; ABTS: 10 μM y t-BuOOH: 116 mM; (■) ABTS^{*+} : 116 μM ; ABTS: 37 μM y t-BuOOH: 116 mM.

El conjunto de datos experimentales fue tratado a la luz de 2 expresiones para la ley cinética, determinadas por el paso que controla el proceso de remoción de ROO^\bullet , es decir reacciones (1.1.3) ó (1.1.4) (Mecanismo I y Mecanismo II, respectivamente). Suponiendo que los radicales peroxilos cumplen la condición de estado estacionario, las leyes de velocidad obtenidas son las siguientes:

Mecanismo I, para la terminación:



$$R_{\text{exp}} = k_3 \frac{k_2 [\text{ROOH}] [\text{ABTS}^{\bullet+}]^2}{k_{-2} [\text{ABTS}] + [\text{ABTS}^{\bullet+}]} \quad (1.1.5)$$

Con pseudo-ordenes de reacción (n):

$$\begin{array}{ll} \text{ABTS} & : -2 \leq n \leq 0 \\ \text{t-BuOOH} & : 1 \leq n \leq 2 \\ \text{ABTS}^{\bullet+} & : 1 \leq n \leq 2 \end{array}$$

Mecanismo II, para la terminación:



$$\begin{aligned} R_{\text{exp}} &= k_4 [\text{ROO}^\bullet]^2 \\ &= k_4 \left(\frac{-k_{-2} [\text{ABTS}] + \sqrt{(k_{-2} [\text{ABTS}])^2 + 4k_3 R_2}}{2k_4} \right)^2 \end{aligned} \quad (1.1.6)$$

Con pseudo-ordenes de reacción:

$$\begin{array}{ll} t\text{-BuOOH} & : \quad n = 1 \\ \text{ABTS} & : \quad -1 \leq n \leq 0 \\ \text{ABTS}^{\bullet+} & : \quad 1 \leq n \leq 2 \end{array}$$

La ecuación (1.1.6) puede ser ordenada:

$$\frac{[\text{ROOH}][\text{ABTS}^{\bullet+}]}{R_{\text{exp}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{k_{-2}}{k_2 k_4} \frac{[\text{ABTS}]}{[\text{ABTS}]} \quad (1.1.7)$$

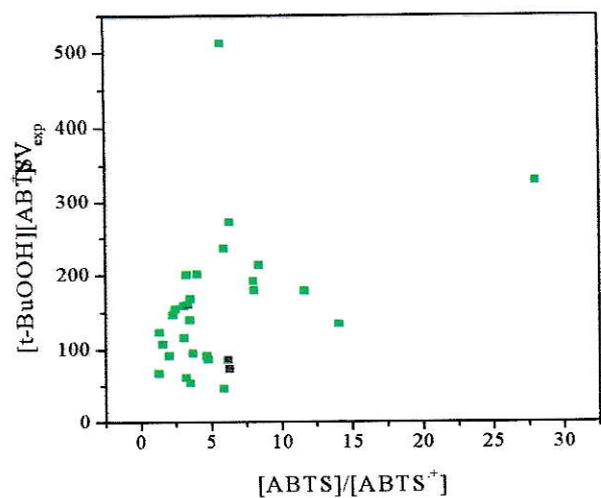
donde ROOH representa al *t*-BuOOH.

La representación gráfica de esta ecuación (Figura 1.1.7A) mostró una correlación muy baja, indicando que este mecanismo no representa adecuadamente al conjunto de datos.

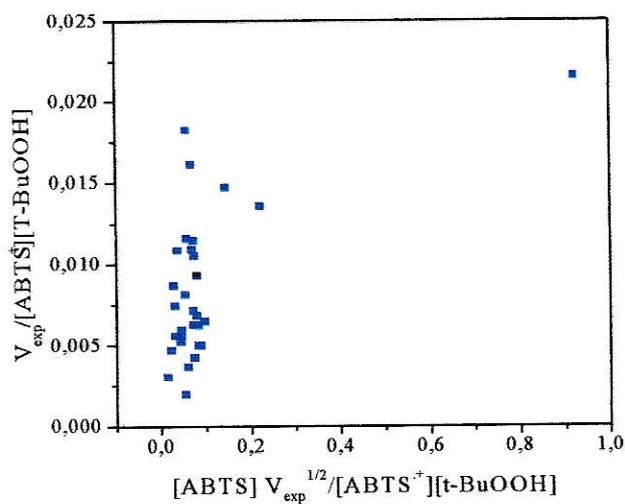
Para probar el Mecanismo I, la ecuación (1. 1.5) fue reordenada a:

$$\frac{R_{\text{exp}}}{[\text{ABTS}\cdot+] [\text{ROOH}]} = k_2 + \frac{k_{-2}}{k_3^{1/2}} \frac{[\text{ABTS}]R_{\text{exp}}^{1/2}}{[\text{ABTS}\cdot+][\text{ROOH}]} \quad (1.1.8)$$

Los datos experimentales tampoco ajustaron a esta expresión (Figura 1.1.7B), indicando que ninguno de los 2 mecanismos satisfacen individualmente al conjunto de datos.



A



B

Figuras 1.1.7. Ajustes para los mecanismos parciales representados por: **A** ecuación (1.1.7) y **B**: ecuación (1.1.8).

A pesar de la aparente simplicidad del mecanismo propuesto, se requiere de una solución numérica para el tratamiento del mecanismo completo. Aplicando la hipótesis de estado estacionario a los radicales peroxilos, la ley cinética puede ser expresada en una compleja ecuación con 5 parámetros que involucra a las ecuaciones (1.1.3) y (1.1.4) como canales de terminación.

$$R = Ak_2^2 \left[\frac{[ABTS^{\bullet+}]^2 [ROOH]^2}{[ABTS]^2} \right] - Ak_2 \left[\frac{2[ABTS^{\bullet+}][ROOH]R}{[ABTS]^2} \right] + A \left[\frac{R^2}{[ABTS]^2} \right] + Bk_2 \left[\frac{[ABTS^{\bullet+}]^2 [ROOH]}{[ABTS]} \right] - B \left[\frac{[ABTS^{\bullet+}]R}{[ABTS]} \right] \quad (1.1.9)$$

donde,

$$A = k_3/k_2^2 \quad \text{y} \quad B = k_4/k_2$$

este procedimiento permite obtener una estimación de k_2 y de los parámetros A y B. Los parámetros obtenidos son resumidos en la Tabla 1.1.

El acuerdo de los datos experimentales para el mecanismo propuesto y las constantes de velocidad pueden ser inferido por una comparación de los valores experimentales con aquellos calculados a través de la ecuación (1.1.9). Este gráfico se muestra en la Figura 1.1.8. Aunque los datos están bastante dispersos, la velocidad

calculada correlaciona bastante bien con aquella determinada experimentalmente sobre todo el rango de condiciones considerada.

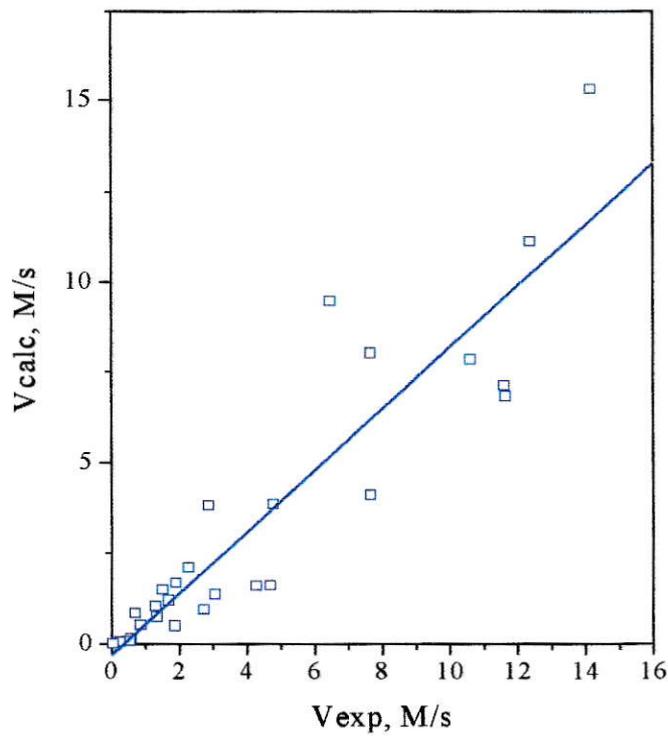


Figura 1.1.8. Relación entre las velocidades medidas experimentalmente y las velocidades calculadas con la Ecuación 1.1.9.

Las constantes de velocidad calculada con el menor error es k_2 . De hecho, los valores calculados para los procesos que siguen a 1.1.2 son más bajos o altos que los valores experimentalmente determinados para el consumo de $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Esto está en acuerdo con la ocurrencia de procesos que compiten (1.1.2, 1.1.3 y 1.1.4). De hecho, si el proceso 1.1.3 ocurre, lleva a:

$$V_{\text{exp}} < V_2$$

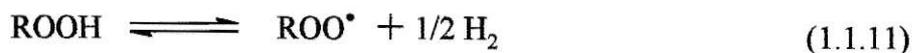
y la ocurrencia de la reacción 1.1.4 lleva a:

$$V_{\text{exp}} \leq 2 V_2$$

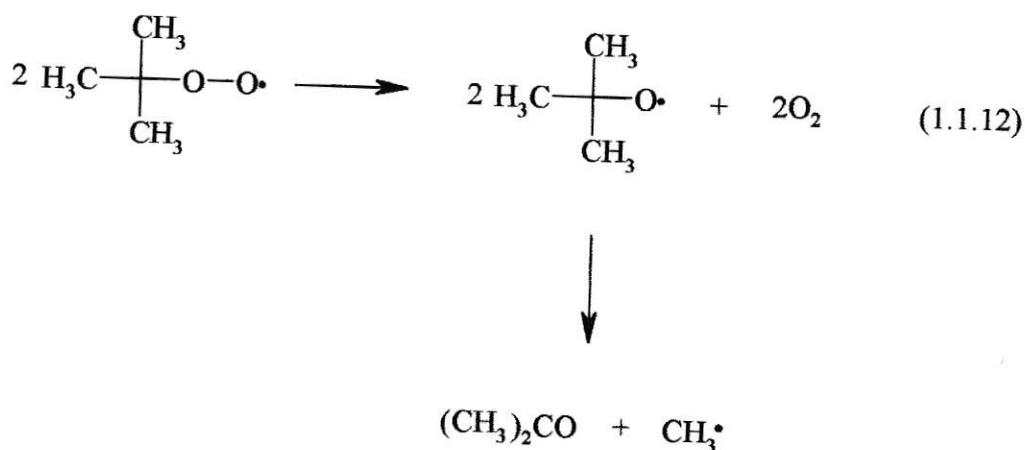
El valor de k_2/k_{-2} da la constante de equilibrio para la reacción (1.1.2). El valor obtenido da $K \cong 10^{12}$, con un $\Delta G^\circ \cong -16.6$ kcal/mol. A partir de estos valores y los valores reportados para el proceso redox [18].



Se puede derivar que, para el proceso



El ΔG° es $\cong 32.3$ kcal. Este resultado es compatible con la energética del proceso. k_3 es considerablemente mas alta que la constante de velocidad propuesta para la reacción en agua, pero del mismo orden de reacciones de terminación cruzada que involucra a radicales peroxilos [19]. Esto podría implicar ya sea que la reacción de ambos radicales $t\text{-BuOO}^\bullet$ es mediada por $\text{ABTS}^{*\dagger}$ y/o que otros radicales peroxidados derivados de la escisión de los radicales $t\text{-BuOO}^\bullet$ (tales como $t\text{-Butoxilos}$ o metilos) que se generan en la interacción de la reacción entre los radicales $t\text{-BuOO}^\bullet$ (Ecuación 1.1.12) podrían contribuir al proceso de terminación.



1.3.1.2. Peróxido de hidrógeno

Las características de la reacción entre peróxido de hidrógeno y los radicales catiónicos derivado del ABTS son muy similares a las ya discutidas para *t*-BuOOH. Si los datos son ajustados a la ecuación (1.1.13):

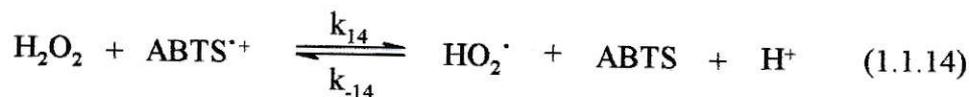
$$\log V = \log k + a \log[\text{ABTS}] + b \log[\text{ABTS}^{\bullet+}] + c \log[\text{H}_2\text{O}_2] \quad (1.1.13)$$

El mejor ajuste se obtiene con:

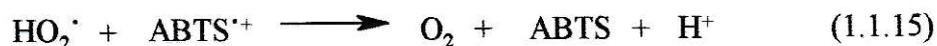
$$k = 4.5 \times 10^{-2}; \quad a = -0.08; \quad b = 1.1; \quad c = 0.7$$

el menor valor de *a*, comparado con el obtenido para el sistema *t*-BuOOH + ABTS^{•+}, refleja un menor efecto inhibitorio del ABTS en este sistema.

El primer paso reversible del mecanismo propuesto para este caso puede ser planteado específicamente:



seguida por una reacción cruzada entre radicales:



para este sistema se obtiene la siguiente ley cinética:

$$\frac{V}{[\text{ABTS}^{\cdot+}][\text{H}_2\text{O}_2]} = k_{14} + \frac{k_{14} [\text{ABTS}] V^{1/2}}{k_{15}^{1/2} [\text{ABTS}^{\cdot+}][\text{H}_2\text{O}_2]} \quad (1.1.16)$$

Al graficar el elemento del lado izquierdo de la ecuación (1.1.16) vs. $[\text{ABTS}]^{1/2}/[\text{ABTS}^{\cdot+}][\text{H}_2\text{O}_2]$ se obtiene una correlación aceptable en donde se puede ver que los datos satisfacen razonablemente el mecanismo planteado (Figura 1.1.9).

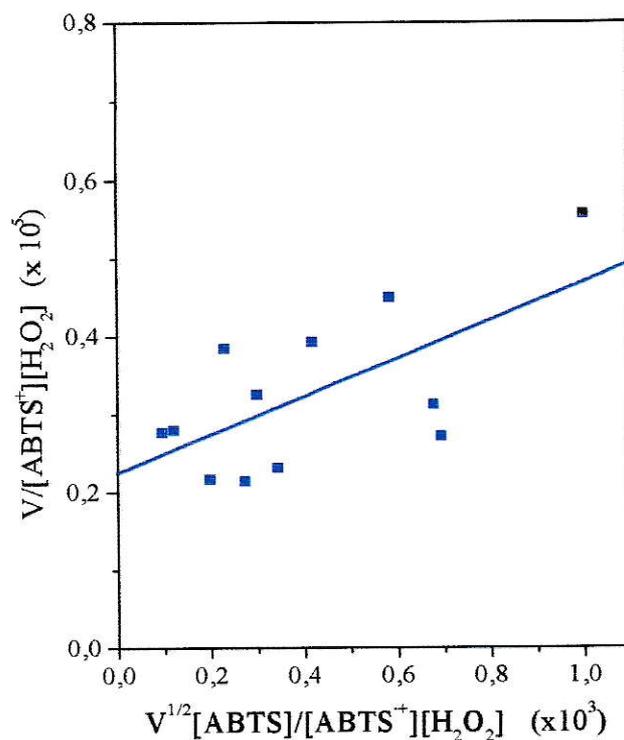


Figura 1.1.9. Datos obtenidos para el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}^{*+}$, graficados de acuerdo a la ecuación 1.1.16. La ordenada permite la estimación de k_{14} ($0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y la pendiente proporciona el valor k_{-14}/k_{15} (0.013).

El valor de $k_{14}/k_{15} = 0.013$ es consistente con el menor efecto inhibitorio de ABTS. Esto podría reflejarse en la mayor efectividad de reacción que se ha denominado cruzada como canal de salidade los radicales peroxilos, descrita en la ecuación (1.1.15). Esta reacción es menos favorecida en el sistema $t\text{-BuOOH} / \text{ABTS}^{*\cdot}$. De acuerdo con esta menor contribución de la ecuación (-1.1.14) la dependencia con el pH también es menor que la observada para el sistema que utiliza $t\text{-BuOOH}$. De hecho, en el rango de pH 3-5 a 7.0, la velocidad del proceso aparece aproximadamente proporcional a $[\text{H}^+]^{-0.5}$ (Figura 1.1.10). Sin embargo, la interpretación cuantitativa esos datos es difícil, debido a la influencia del pH en la protonación y de las reacciones secundarias de los radicales HOO^{\cdot} [20].

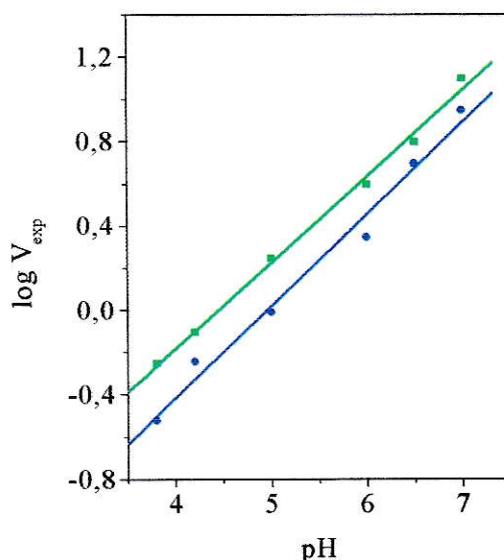


Figura 1.1.10. Efecto de pH en la velocidad inicial de reacción entre $\text{ABTS}^{*\cdot}$ y H_2O_2 . Las concentraciones iniciales fueron: $\text{ABTS}^{*\cdot}$: 50 μM ; ABTS 20 μM y H_2O_2 : 166 mM (■) y 232 mM (●).

Es interesante notar que los valores obtenidos para las constantes de velocidades específicas para las reacciones del radical catión con t-butilhidroperóxido o agua oxigenada son similares. Estos resultados podrían ser explicados en términos de la similitud entre las energías del enlace O-H en estado gaseoso) del H_2O_2 y el peróxido orgánico [21, 22].

Los resultados de este trabajo presentan algunas similitudes pero también significativas diferencias con los datos obtenidos empleando fenoles como sustatos [6]. La principal diferencia radica en la falta de equilibrio del primer paso y una velocidad considerablemente mas baja para las reacciones con hidroperóxidos. La velocidad de reacción más alta para el caso de los fenoles puede ser relacionada con la menor energía de enlace O-H en estos compuestos [23, 24]. Este mismo argumento podría favorecer la ocurrencia de la reacción inicial con el radical catión. La completa reversibilidad del primer paso para el caso de los fenoles podría implicar en una menor eficiencia de los canales para la salida de los radicales fenoxilos.

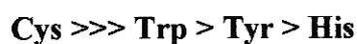
Finalmente, es interesante considerar que el blanqueamiento de la solución de radicales catión derivados del ABTS ha sido propuesta como método para evaluar capacidad antioxidante. Sin embargo, este estudio muestra que pro-oxidantes, tales como tert-Butilhidroperóxido y peróxido de hidrógeno, pueden llevar a un eficiente consumo de los radicales derivados del ABTS.

Compuesto	$k_2/M^{-1}s^{-1}$	k_{-2}/k_3
H ₂ O ₂	11.2	0.013
t-BuOOH	8.6×10^{-3}	0.03

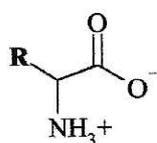
Tabla 1.1. Valores para las constantes de velocidad para agua oxigenada y tert-butilhidroperóxido

1.3.2. Amino ácidos

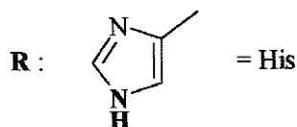
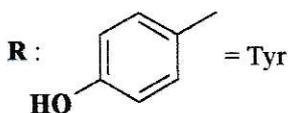
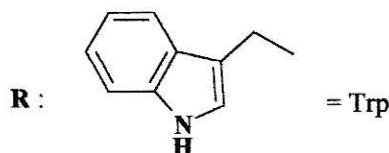
Perfiles cinéticos obtenidos para los cuatro aminoácidos bajo condiciones similares se muestran en la Figura 1.2.1. La información de ésta figura muestra que, bajo condiciones similares, la reactividad sigue el orden:



Esta escala de reactividades relativas, indica que la velocidad está determinada por las características del grupo **R** de cada aminoácido y que la cadena alifática sería totalmente no-reactiva (Esquema 1.2.1).



R : -SH = Cys



Esquema 1.2.1. Estructura de los aminoácidos utilizados.

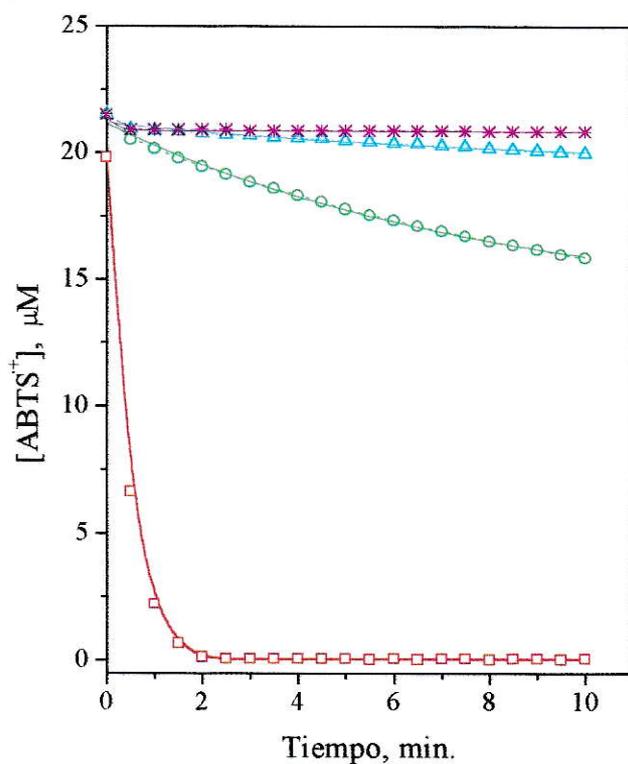


Figura 1.2.1. Perfiles obtenidos para la reacción de blanqueamiento del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ promovido por Cys (\square), Trp (\circ), Tyr (Δ) e His ($*$), en todos los casos las condiciones empleadas fueron similares $[\text{ABTS}^{\bullet+}] \approx 22 \mu\text{M}$; $[\text{ABTS}] = 50 \mu\text{M}$; $[\text{aminoácido}] = 30 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7$

Este resultado estaría en acuerdo con los datos de capacidad antioxidante de aminoácidos reportados por Meucci y Mele [17] Esos autores concluyen, a partir de experimentos llevados a cabo en el sistema ABTS/peroxidasa, que Cys es el mejor antioxidante y que Tyr y Trp muestran patrones de reactividad similares.

1.3.2.1 Cisteína

La reacción de Cys con el radical catión derivado del ABTS presenta características similares a las descritas para los hidroperóxidos: la velocidad de la reacción aumenta con el pH, también con el aumento de las concentraciones del radical catión y de Cisteína y se inhibe parcialmente con ABTS. Cuando la velocidad inicial (V_0) se mide a diferentes pHs, empleando concentraciones constantes de ABTS, $ABTS^{\bullet+}$ y Cys, las medidas pueden ser ajustadas a la siguiente ecuación:

$$\log V_0 = k - \delta pH \quad (1.2.1)$$

Donde k es una constante que contiene la contribución de todos los reactantes y productos en la velocidad del proceso. El gráfico de $\log V_0$ vs. pH permite obtener una evaluación del orden de la reacción en protones ($-\delta = 0.22$) (Figura 1.2.2). Este valor fue medido en el rango de pH 5 a 7 y conlleva a una alta incerteza, ya que la alta velocidad

del proceso impide una evaluación más precisa de la velocidad inicial, particularmente a los pHs más altos.

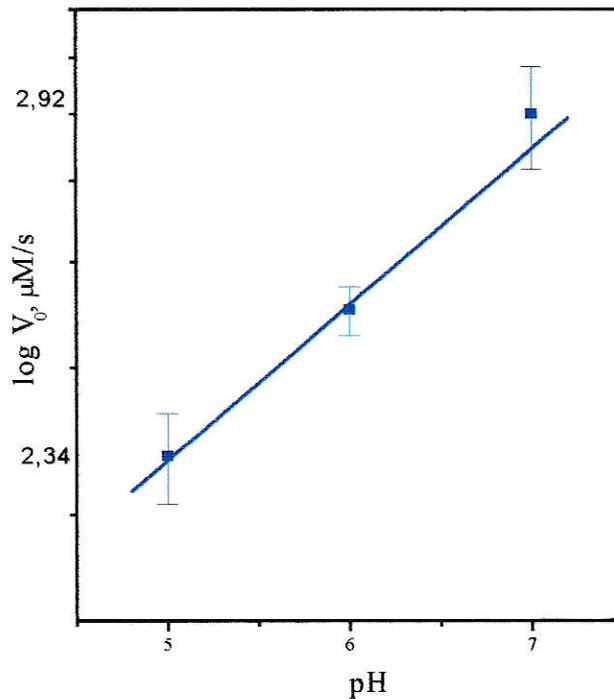


Figura 1.2.2. Efecto del pH sobre la velocidad de la reacción entre ABTS^{*+} y Cys. $R = 0.996$

Las velocidades de reacción, sobre un amplio rango de condiciones, pueden ser medidas sólo a pH 5. A pHs mayores la velocidad de reacción es muy rápida. Los

coeficientes asociados a los ordenes de reacción según la ecuación (1.2.1) están resumidos en la Tabla 1.2. (página 54)

$$V_0 = k[\text{ABTS}]^\alpha [\text{ABTS}^{\bullet+}]^\beta [\text{Cys}]^\chi \quad (1.2.2)$$

La correlación entre los valores calculados de V_0 empleando el conjunto de parámetros de la Tabla 1.2 y aquellos determinados experimentalmente, se muestra en la Figura 1.2.3A. Esta figura muestra que la ecuación 1.2.2 reproduce los datos con un factor aproximado de 1.5 sobre todo el rango de condiciones empleado. Los ordenes fraccionales y la dispersión de los datos, los que superan del error experimental, implica que el mecanismo es complejo y no queda completamente representado por una ley cinética simple como la que se ha dado en la ecuación 1.2.2.

Las velocidades experimentales fueron independientes del procedimiento empleado para generar el $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Figura 1.2.3A). En ensayos realizados con soluciones con agua pre-tratada con Chellex-100, no se observó que el efecto de metales afectara a la velocidad de la reacción. Así mismo, experimentos realizados bajo Nitrógeno indicaron que la presencia de oxígeno no modifica la velocidad del proceso (Figura 1.2.3 B).

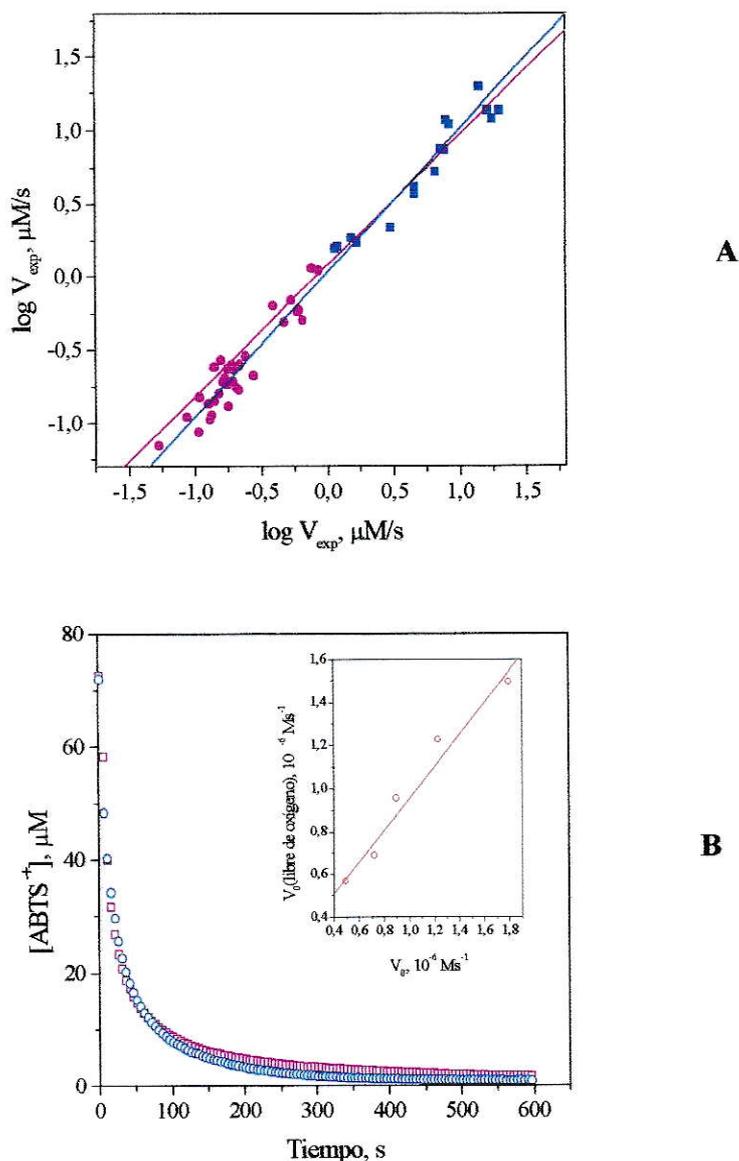


Figura 1.2.3. A. Correlación de las velocidades iniciales para el consumo de $ABTS^{*+}$ por Cys, experimentales y calculadas con los datos obtenidos con la Ecuación 1.2.2 (●) datos obtenidos para $ABTS^{*+}$ preparado con Persulfato de Potasio y (■) $ABTS^{*+}$ preparado con MnO_2 . **B.** Correlación entre las velocidades iniciales obtenidas en presencia y en ausencia de Oxígeno, $R=0.96$.

La formación de ABTS, medida por el aumento de la absorbancia a los 340 nm, Figura 1.2.4, es casi cuantitativa con el consumo del radical catión a lo largo de todo el proceso llevado a cabo en exceso de radical catión y de Cys.

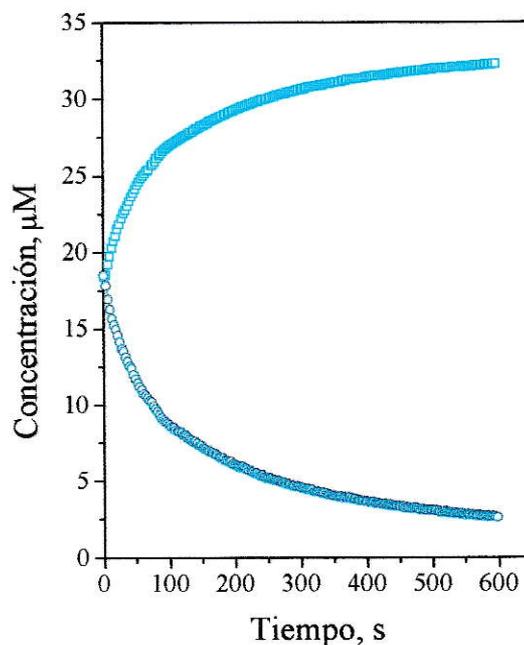


Figura 1.2.4. Cinética de la reacción entre Cys y $\text{ABTS}^{\bullet+}$, seguida por el aumento de la señal a los 340 nm (ABTS) (□) y el consumo de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ seguida a partir de la disminución de la señal a los 734 nm (○).

La estequiometría de la reacción entre el radical catión y la Cys fue obtenida en exceso de radical e indica que se consumen aproximadamente 1.8 radicales por cada cisteína introducida en el sistema. La ecuación (14) describe el proceso global:



1.3.2.2. Triptofano

La reacción entre Trp y el radical catión conserva el mismo patrón al obtenido por Cys. Sin embargo, y considerando que la velocidad del proceso es más lenta, las velocidades iniciales pueden ser obtenidas en un rango mas amplio de condiciones. Los datos cinéticos obtenidos a pHs 5, 6 y 7, fueron ajustados a la ecuación (1.1.2) y proporcionan los pseudo ordenes de reacción resumidos en la Tabla 1.2 La velocidad de reacción no mostró ser afectada por la presencia de metales.

El consumo del radical catión es acompañado por un notable consumo de oxígeno, medido con un electrodo selectivo de oxígeno. De hecho, cerca de 0.33 moles de oxígeno son consumidos por cada por cada mol de radical. Luego de registrar la formación de ABTS, evaluado a partir del aumento en la absorbancia a los 340 nm (Figura 1.2.5) es casi cuantitativa y los resultados obtenidos en exceso de radical catión se obtuvo que, aproximadamente cada molécula de Trp consume 3 radicales. Por lo tanto la estequiometría del proceso global puede ser representada por:



Los productos de la reacción muestra una fluorescencia (excitación a los 370 nm y emisión a los 450 nm) que sugiere la presencia de kynurrenina y N-formilkinurrenina

entre los productos (Figura 1.2.5). Estos productos de oxidación de Trp, medidos por los cambios en la fluorescencia, fueron similares a las observadas cuando Trp es expuesto a una fuente de radicales libres [25].

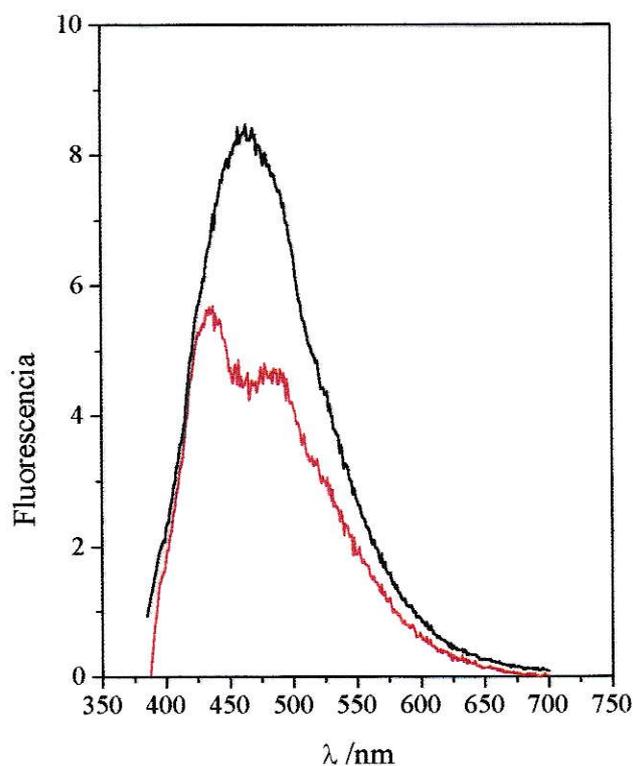


Figura 1.2.5. Espectros de Fluorescencia para los productos oxidados de Trp, (—) condiciones iniciales: 300 μM Trp, 70 μM ABTS^{*+} , 80 μM ABTS; (—) Espectro correspondiente a la sustracción del espectro de ABTS formado en la reacción más el inicial (150 μM), $\lambda_{\text{ex.}} = 370$.

A pesar del alto consumo relativo de oxígeno en el proceso (indicativo de la oxidación de Trp), las velocidades iniciales del consumo del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ inducido por Trp, medidas a pH 7, muestran un aumento aproximado de sólo un 10% (no significativo) al ser evaluadas en experimentos con presencia de oxígeno en el sistema:

Condiciones	$V_0 / \mu\text{M s}^{-1}$
Nitrógeno	1.89 ± 0.23
Aire	2.03 ± 0.15

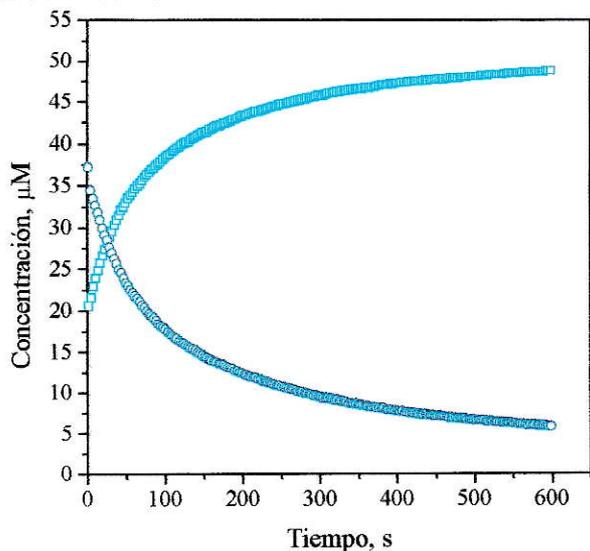
Tabla 1.2. Velocidades iniciales evaluadas para experimentos realizados con y sin presencia de oxígeno (aire), en ambos casos las condiciones iniciales fueron similares: $\text{ABTS}^{\bullet+} = 50 \mu\text{M}$; $\text{ABTS} \cong 90 \mu\text{M}$ y $\text{Trp} = 64 \mu\text{M}$).

Esto podría indicar que el consumo de oxígeno no estaría involucrado en la etapa inicial del proceso, sino más bien en reacciones secundarias que involucrarían a radicales derivados del Trp y que no influenciaría en la velocidad del proceso.

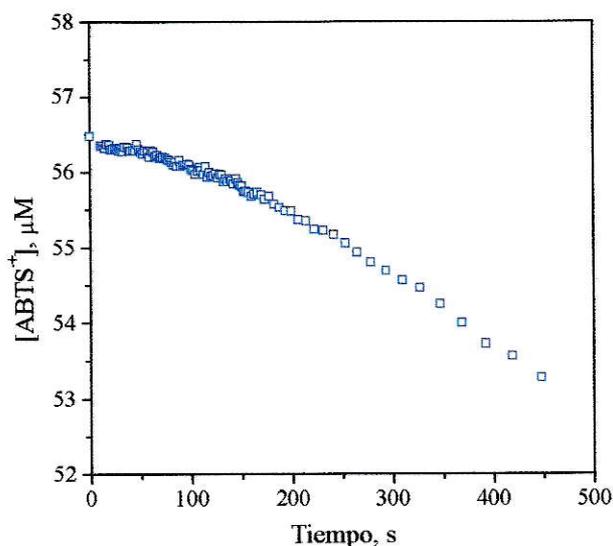
1.3.2.3 Tirosina e Histidina

Estos dos aminoácidos presentaron características similares con respecto al consumo del radical catión y la formación de ABTS, a las ya descritas para Cisteína y Triptofano. Los pseudo ordenes de reacción obtenidos cuando el conjunto de los parámetros cinéticos medidos a pH 5 para Tirosina y pH 7 para Histidina, son ajustados a la ecuación (1.1) están incluidos en la Tabla 1.1. La reacción del radical catión con Tyr muestra que la formación de ABTS es cuasi-cuantitativa (Figura 1.2.6 A).

Histidina muestra un patrón cinético muy complejo que incluye una reacción inicial muy rápida, seguido por un proceso lento y, a tiempos largos, un proceso auto-acelerado (Figura 1.2.6 B). Además, debido a que todo el proceso es muy lento, la velocidad sólo pudo ser medida a pH 7. A pHs más bajos, la reacción es extremadamente lenta. Las velocidades medidas corresponden a la fase lenta (intermedio) de la reacción. Debido a que las reacciones fueron llevadas a cabo en exceso de His no fue posible determinar los factores estequiométricos de este proceso.



A



B

Figura 1.2.6. A. Perfil cinético para la reacción entre Tyr (30 μM) y $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (○) disminución de la concentración del radical cation seguida a los 734 nm; (○) aumento de la concentración de ABTS evaluada a los 340 nm. **B.** Perfil cinético obtenido para el consumo de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ inducido por His a pH 7.0. Este perfil corresponde a una compleja conducta cinética con notable período de autoaceleración a tiempos largos de la reacción.

1.4. DISCUSION GENERAL

El esquema descrito por las reacciones (1.2), (1.3) y (1.4), en donde los radicales ROO^{\bullet} pueden representar a los radicales de los aminoácidos (X^{\bullet}) generados en el proceso de abstracción de hidrógeno permiten explicar los resultados obtenidos para los amino ácidos estudiados, Cisteína, Triptofano y Tirosina. La relación entre reactividad y la presencia de un átomo de hidrógeno lábil en la estructura de ellos es compatible con la nula reactividad que se obtuvo empleando como sustratos del $ABTS^{\bullet+}$ a Cistina, O-metil-Tirosina, S-metil-Cisteína y Metionina. Para éstas reacciones se emplearon concentraciones en el rango mili-molar de los derivados metilados y de Cistina y fueron mantenidas por una hora sin observar reacción.

Las reacciones de los radicales derivados de los aminoácidos obtenidos por abstracción de su hidrógeno (X^{\bullet}) con oxígeno, pueden proporcionar un canal extra de consumo de X^{\bullet} , particularmente cuando son empleados Triptofano y Cisteína. Sin embargo, el hecho de que la velocidad del blanqueamiento del $ABTS^{\bullet+}$ por los aminoácidos es casi independiente de la presión de oxígeno, sugiere que la reacción oxígeno/radical no es cinéticamente relevante.

Este simple mecanismo predice que el orden de inhibición por protones y en $ABTS$ debe ser similar. La magnitud de esos ordenes debe estar relacionado con la magnitud de la reversibilidad del primer paso, en un rango que puede ir entre cero (ausencia de reversibilidad) y dos (reversibilidad completa, en donde la reacción (1.3)

sería la encargada de remover a los radicales X^{\bullet}). Los altos ordenes de reacción aparentes para ABTS y $ABTS^{\bullet+}$ obtenidos para Trp a pH 5 (mayores que para pH 7) son compatibles con la mayor contribución de la reacción inversa del primer paso cuando la concentración de protones aumenta. Los bajos ordenes de reacción de estos dos efectos para el caso de Cisteína sugiere que el primer paso de la reacción está lejos del equilibrio. Esto es compatible con la alta velocidad determinada para este aminoácido, que puede ser atribuida a la labilidad relativa del enlace S-H. Este criterio podría indicar que en las reacciones con los otros aminoácidos, la transferencia de hidrógeno inicial es más reversible. Sin embargo, tal como lo predicen las ecuaciones del mecanismo propuesto (1.2) a la (1.4), éstas deben ser consideradas sólo como una primera aproximación.

Los ordenes obtenidos para la reacción con Tirosina son los más cercanos a los esperados si el paso inicial fuera totalmente reversible, como ya fue reportado para los fenoles [6]. Con el objeto de probar esta posibilidad, las velocidades experimentales fueron graficadas contra $[ABTS^{\bullet+}]^2[Tyr]/[ABTS]$, como se muestra en la Figura 1.2.7. El resultado muestra que, sobre todo el rango de condiciones empleado, los datos se ajustan a la ley cinética esperada si la reacción (1.2) alcanza el equilibrio y la reacción (1.3) fuera el paso prioritario para la remoción de los radicales derivados de la Tirosina generados en el primer paso, como producto de la abstracción del H fenólico. Para este compuesto la ley de velocidad puede ser considerada como:

$$-\frac{d[\text{ABTS}^{\bullet+}]}{dt} = k_{\text{exp}} \frac{[\text{ABTS}^{\bullet+}]^2 [\text{Tyr}]}{[\text{ABTS}]} \quad (1.5)$$

con

$$k_{\text{exp}} = K_2 k_3 \quad (1.6)$$

A pH 7.0, el mejor valor para la k_{exp} obtenida a partir del gráfico de la Figura 1.2.7 es $1.65 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

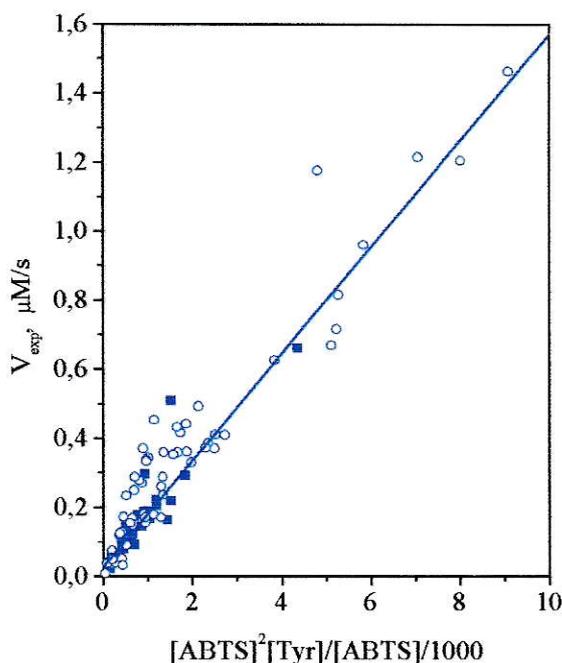


Figura 1.2.7. Ajuste del conjunto de datos obtenidos para la reacción de Tyr con el radical catión para un mecanismo completamente reversible, de acuerdo a la ecuación (1.6) las velocidades experimentales son graficadas contra $[\text{ABTS}^{\bullet+}]^2[\text{Tyr}]/[\text{ABTS}]$. La correlación es $R = 0.9$. (○) $\text{ABTS}^{\bullet+}$ preparado con persulfato; (■) preparado con MnO_2 .

El análisis cinético para Cys, Trp e His se realizó a la luz de los Mecanismos I y II tal como se presentó para los hidroperóxidos.

Ninguno de los tres aminoácidos se ajustó a las ecuaciones descritas para los mecanismos individuales (1.1.7 y 1.1.8), siendo el mecanismo completo que involucra los 3 pasos del mecanismo planteado, el que mejor ajusta a los resultados obtenidos. Los mejores valores para los 5 parámetros de la ecuación (1.1.9) (k_2^2 ; k_2 ; A; k_6 y B) fueron obtenidos numéricamente empleando una metodología de mínimos cuadrados implementado en un paquete computacional matemático MAPLE-V. Este procedimiento permitió una estimación de k_2 , A y B. Los valores obtenidos fueron resumidos en la Tabla 1.5. Aunque esos valores están sujetos a una gran incerteza, particularmente A y B, permiten extraer algunas conclusiones.

Los valores obtenidos muestran que la reactividad de los compuestos tratados está directamente relacionada con el valor específico de la constante de velocidad del paso inicial. De hecho, esta constante de velocidad es la más alta para Cisteína (el aminoácido más reactivo) y la más baja es para el aminoácido menos reactivo. Además, los valores relativos de k_6 están en acuerdo con lo esperado para una abstracción de hidrógeno por un radical libre. De hecho, pueden ser propuestos dos posibles mecanismos extremos para el primer paso (reacción 1.2). En el primero de ellos, una transferencia de hidrógeno:



seguida por la deprotonación de ABTSH^+ . Si éste fuera el proceso limitante, se podría esperar que la velocidad relativa fuera similar a la de otros procesos radicalarios [26], de acuerdo con los valores relativos que fueron obtenidos para k_6 en este trabajo:



y una muy baja o nula reactividad para N-metil-Triptofano, O-Metil-Tirosina y Cistina.

El otro extremo del mecanismo involucra una transferencia electrónica seguida por la deprotonación del radical derivado del sustrato. Este primer paso podría correlacionar inversamente con los potenciales de ionización (PI) de cada aminoácido. Sin embargo, utilizando cálculos semi-empíricos (metodología AM1 [27]) para obtener los valores de energías mono-electrónicas del orbital de frontera HOMO (último orbital ocupado) y posteriormente aplicando el teorema de Koopman [28] se obtuvieron los siguientes valores:

Especie	PI/eV
Cys^{a)}	-9.35
Trp	-8.38
Tyr	-9.15
His	-9.32

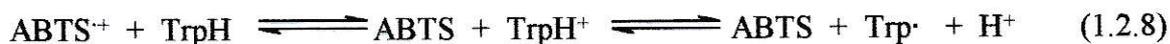
Tabla 1.3. Potenciales de ionización para los aminoácidos empleados.

^{a)}Este valor obtenido se encuentra en acuerdo con datos reportados por P.H. Cannifton [29]

Esto sugiere que un primer paso inicial limitante mediado por una transferencia electrónica no es favorable, al menos para Cisteína.

Los valores de A y B dados en la Tabla 1.5 son compatibles con los esperados para un mecanismo que comprende los procesos (1.2), (1.3) y (1.4). De hecho, ya que las concentraciones de ABTS y su radical catión son del mismo orden de magnitud, los valores obtenidos 0.2 y 1.0 para la razón k_3/k_2 son consistentes con una reversibilidad parcial del primer paso de la reacción (1.2).

Los datos obtenidos para Trp muestran que la disminución en la velocidad de reacción cuando el pH disminuye puede ser asociada a un aumento en k_2 , en acuerdo con el mecanismo propuesto. Esto implica que los radicales catiónicos del ABTS estarían reaccionando con la molécula neutra y no con una pequeña fracción del compuesto protonado en equilibrio. En este sentido el paso inicial para este sustrato puede ser representado por:



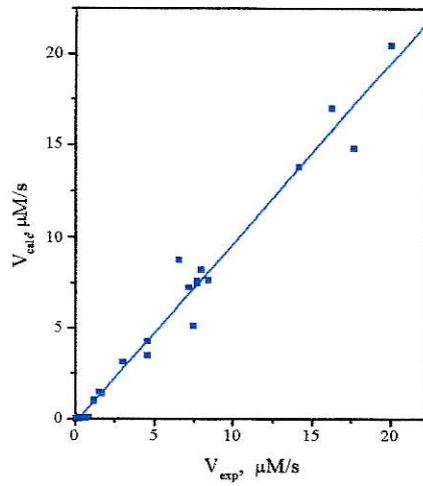
y no por una deprotonación del aminoácido:



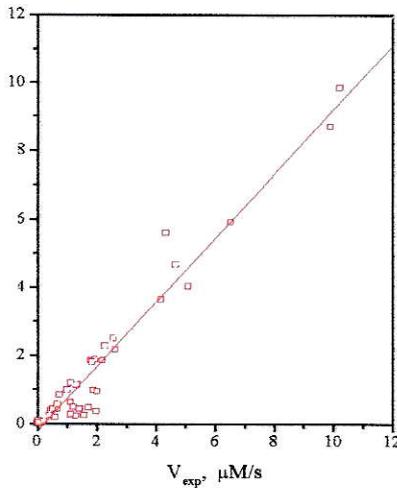
seguida por una reacción del compuesto deprotonado con el radical catión derivado del ABTS.

Con el fin de determinar si los parámetros dados en la Tabla 1.5 son adecuados para reproducir los datos experimentales sobre todo el amplio rango de condiciones experimentales empleada, se graficaron las velocidades calculadas utilizando la ecuación general (1.1.9) contra las velocidades obtenidas experimentalmente. Los datos obtenidos empleando Cys, Trp e His se muestran en la Figura 1.2.8 (A, B y C, respectivamente).

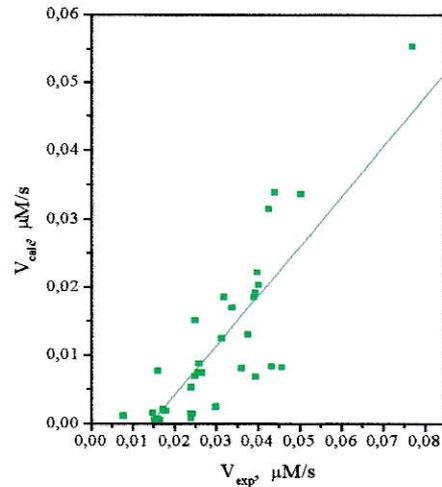
Esos datos muestran que la ecuación propuesta ajusta razonablemente los datos obtenidos experimentalmente en todo el rango de condiciones empleadas. Esto indica que el mecanismo completo es capaz de interpretar las principales características del proceso cinético.



A



B



C

Figura 1.2.8. Correlación entre las velocidades medidas experimentalmente y calculadas. Las velocidades fueron calculadas de acuerdo con la ecuación (1.1.9) y los parámetros de la Tabla 1.2. Datos obtenidos para **A:** Cys pH 5 ($R = 0.99$); **B:** Trp pH 5 ($R = 0.97$); **C:** His, pH 7 ($R = 0.85$)

Aminoácido	$k^{a)}$	A	B	C	D
Cys pH5	2.2×10^{-3}	-0.46	1.5	0.83	~-0.22
Trp pH5	9.6×10^{-5}	-1.81	2.4	0.8	} -1.0
PH7	6.7×10^{-3}	-1.0	1.4	0.7	
Tyr pH7	8.91×10^{-4}	-1.13	1.92	0.78	~-0.60
His pH7	3.75×10^{-3}	-0.33	0.11	0.40	-

Tabla 1.4. Resumen de los valores para los ordenes de reacción obtenidos por la ecuación (1.1)

^{a)} El valor de k fue obtenido cuando la concentración es expresado en μM y el tiempo en segundos.

Aminoácido	$k_4 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	A / M s	B
Cys pH 5	1900 ± 300	$5.0 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}$	0.16 ± 0.01
Trp pH 5	300 ± 200	$1.6 \times 10^{-4} \pm 6 \times 10^{-5}$	1.0 ± 0.9
pH7	350 ± 20	$2.7 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.17 ± 0.01
His pH 7	0.5 ± 0.2	0.010 ± 0.004	0.30 ± 0.02

Tabla 1.5. Parámetros obtenidos para la ecuación (1.9).

1.5 CONCLUSIONES

En conclusión, los datos obtenidos muestran que tanto los hidroperóxidos empleados como los aminoácidos son capaces de blanquear el radical catiónico derivado del ABTS cuando éste es pre-formado previo a la reacción y que la recuperación del ABTS original es casi cuantitativa. La velocidad de los procesos queda determinada principalmente por la presencia de los Hidrógenos lábiles de la cadena lateral en las estructuras de los aminoácidos (Esquema 1.2.1). La principal característica de la ley cinética puede ser explicada en términos de un mecanismo que involucra un primer paso parcialmente reversible. La relevancia de la reacción inversa depende del pH de la solución.

Varios aspectos desconcertantes quedan en evidencia al revisar los datos, como: el efecto del oxígeno en la velocidad de la reacción, la casi total recuperación del ABTS original independiente de la relevancia de la Ecuación (1.3) y la dispersión de los datos aún cuando los datos son tratados a la luz del mecanismo completo. También, la ausencia de relación entre la ley de velocidad y los factores estequiométricos, que reflejan la importancia de los procesos (1.3) y (1.4), como lo reportado en el trabajo de los fenoles realizado por Campos *et al.* [6]. Todos estos factores sugieren que el mecanismo descrito por las Ecuaciones (1.2), (1.3) y (1.4) es una sobre-simplificación del mecanismo total y que algunos productos, probablemente aquellos que se formarían en la Ecuación (1.3), no son estables. La descomposición de los productos iniciales podrían consumir oxígeno y aumentar la producción de ABTS, y modificando de esta manera la

estequiometría sin alterar la velocidad inicial evaluada en este trabajo. Es interesante notar que, en algunos compuestos, tales como Trolox y Catequina, se observa que en los primeros instantes de la reacción (antes de los 10 segundos de reacción) ocurre un consumo extra del radical catión que luego de un corto período es recuperado (Capítulo III de la presente Tesis). Esto podría ser explicado por una transformación de los productos de la reacción cruzada ($\text{ABTS}^{\bullet+}$ + radical derivado del aminoácido) de la Ecuación (1.3) en productos del tipo que se producen en la Ecuación (1.4).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el mecanismo de las reacciones del radical catión derivado del ABTS son extremadamente complejas. Esto implica que deben ser tomadas grandes precauciones al utilizar el blanqueamiento o el retardo de la formación de este radical en técnicas para evaluar capacidades antioxidantes, particularmente cuando la información es derivada de medidas que se llevan a cabo en reacciones que consideran una sola concentración de sustrato y/o un solo tiempo de reacción [14]. Además, la acción pro-oxidante que ejercen los hidroperóxidos, mostrada en la primera parte de este Capítulo debe ser tomada en cuenta al evaluar la oxidación del ABTS por el sistema H_2O_2 /peroxidasa/ABTS.

1.6. REFERENCIAS

1. M.B. Arnao, J.L. Casa, J.A. del Rio, M. A. Costa and F. García Cánovas, *Analytical Biochem.* **85**, 335 (1990)
2. N.J. Miller, A.T. Diplock and C.A. Rice-Evans, *J. Agr. Food Chem.* **43**, 1794 (1995).
3. H. Wang, G. Cao, R.L. Prior, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 701 (1996)
4. N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, *Methods Enzymol.* **234**, 279 (1994).
5. N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburgand, C.A. Rice-Evans, *Archives of Biochem. Biophysics.* **322**, 339 (1995)
6. A. M. Campos and E.A. Lissi, *Int. J. Chem. Kinet.* **29**, 219 (1997)
7. N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, *Free Rad. Res.* **26**, 195 (1997)
8. C. Romay, C. Pascual and E.A. Lissi, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 2089 (1980).
9. N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Miller, *Clin. Sci.* **84**, 407 (1993).
10. T. Kurechi, K. Kikugawa and T. Kato, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2089 (1980).
11. J.S. Hogg, D.H. Lohmann and K.E. Russell, *Can. J. Chem.* **39**, 1588 (1961).
12. T. Kurechi and T. Kato., *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 2964 (1982).
13. P.H. Ayscough and K.E. Rusell, *Can. J. Chem.* **45**, 3019 (1967).

14. R.Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C.A. Rice-Evans, *Free Rad. Biol. Med.* **9/10**, 1231 (1999).
15. M. Wasil and F.J. Kelly, *Redox Reports* **1**, 361 (1995).
16. N. J. Miller and C.A. Rice-Evans, *Redox Reports* **2**, 161 (1996).
17. E. Meucci and M.C. Mele, *Amino Acids* **12** 373 (1997).
18. S. L. Sott, W-J. Chen, A. Bakac and J.H. Espenson, *J. Ohys. Chem.* **97**, 6710 (1993).
19. J. E. Bennett, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86**, 3247 (1990).
20. B. H. J. Bielski, *Meth. In Enzimol.* **105**, 81 (1984).
21. D. M. Golden, V.M. Bierbaum and C. J. Howard, *J. Phys. Chem.* **94**, 5413 (1990).
22. L.G. S. Shum and S. W. Benson, *J. Phys. Chem.* **87**, 3479 (1983).
23. M.C.J. Coronel and A.J. Colussi, *Int. J. Chem. Kinet.* **20**, 749 (1988)
24. A. J. Colussi, F. Zabel and S. W. Benson, *Int. J. Chem. Kinet.* **9**, 161 (1977).
25. M. Friedman and J. L. Cuq, *J. Agric. Food Chem.* **36**, 1079 (1988).
26. E. A. Lissi, M Faure and N. Clavero, *Free Rad. Res. Commun.* **14**, 373 (1991).
27. M. J. S. Dewar, E. G. Zoebish and E. F. Healy, *J.Am. Chem. Soc.* **107**, 3902 (1985)
28. T. Koopman, *Physica* **1**, 104 (1934)
29. P.H. Cannington and N. S. Ham, *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* **3**, 315 (1974).

CAPITULO II

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES

2.1.1 INTRODUCCIÓN

A la fecha son varios los ensayos que se han propuesto para medir la actividad antioxidante en fluidos biológicos, en extractos de alimentos y de compuestos puros [1-4]. Todos estos métodos involucran la generación de algún radical libre, el que actúa a través de un mecanismo particular con el sustrato [5-6]. En suma son dos los tipos de metodologías que se pueden distinguir y que deben ser consideradas al momento de elegir la técnica con que se hará tal evaluación. Por un lado están los ensayos que hacen una evaluación directa de la velocidad de reacción entre el radical libre y el antioxidante, el que actúa como un dador de hidrógeno o de electrón [7]. Esta medida se hace relativa a un compuesto que reacciona con una velocidad y estequiometría conocida con el radical. Usualmente el estándar empleado como un marcador de actividad antioxidante en este tipo de evaluaciones es el Trolox [8]. Otro tipo de análisis involucra la adición de

un antioxidante o de una mezcla compleja de ellos, a un sistema que mantiene una concentración estacionaria de radicales libres. La medida de la capacidad antioxidante en este tipo de ensayos es indirecta y la información puede ser obtenida a través de los tiempos en que el antioxidante mantiene controlada la acción de los radicales libres generados. Esto se evalúa empleando como medida de la concentración de radicales la velocidad de consumo de un sustrato (proteínas o lípidos) cuya oxidación puede ser medida en forma fácil y continua [9-12]. Una de las dificultades que presenta este tipo de ensayo, es la interpretación de los resultados al momento de intentar conocer qué mide la técnica o por cuál mecanismo actúa él o los antioxidantes involucrados. Así, se postula que éstos pueden actuar ya sea retardando la producción de los radicales, reparando el daño inducido a la proteína o al lípido o reaccionando directamente con los radicales generados.

En esta tesis la técnica empleada para medir la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos seleccionados es la medida de una reacción directa entre un radical estable (el $ABTS^{\bullet+}$) y los sustratos. Estos radicales son pre-formados previo a su reacción con el antioxidante, por lo que su concentración inicial y el consumo inducido por los compuestos a evaluar pueden ser conocidos por técnicas espectrofotométricas (ver Capítulo I)

2.1.2 METODOLOGIA

Método basado en la decoloración del catión derivado del Radical ABTS.

La metodología empleada para la evaluación de la Capacidad Antioxidante (CAO) de compuestos fenólicos y polifenólicos es similar a la ya previamente descrita por Campos y Lissi [13] y Romay *et al* [8]. La principal diferencia radica en el método empleado para producir el radical catión. En este trabajo, el radical catión es producido mediante la oxidación mono-electrónica promovida por dióxido de Manganeso (MnO_2). La adición de 25 mg/ml del óxido a una solución 100 μM de ABTS disuelto en una solución amortiguada 100 mM de sales K_2HPO_4 y KH_2PO_4 reguladas a pH 7, genera instantáneamente el característico color verde-azul que evidencia la formación del radical. Luego de la centrifugación y filtración de la solución para remover el exceso de óxido, la concentración final del radical es evaluada por una de sus bandas de absorción característica a los 734 nm, mientras que la concentración del ABTS precursor que queda sin transformar puede ser evaluada por su absorbancia a los 340 nm. La solución que contiene el radical preparado puede ser mantenida en frío sin que varíe su concentración por varias horas.

La incorporación de aditivos en el rango μM , ya sea de compuestos puros o de mezclas complejas (por ejemplo: vino) produce la disminución de la absorbancia a los 734 nm, indicando con esto el consumo del radical. Este consumo se relaciona directamente con la capacidad del compuesto para blanquear la solución coloreada del

radical catión pre-formado permitiendo obtener medidas de reactividad (a partir de la velocidad del proceso) y estequiometrías (a partir del consumo total). Los compuestos puros, fenoles y polifenoles empleados en este estudio, se encuentran en la Figura 2.1.1. Se emplearon además muestras de vino cepa Carbernet Sauvignon y Sauvignon Blanc de la Viña Santa Emiliana, cosecha del año 1998.

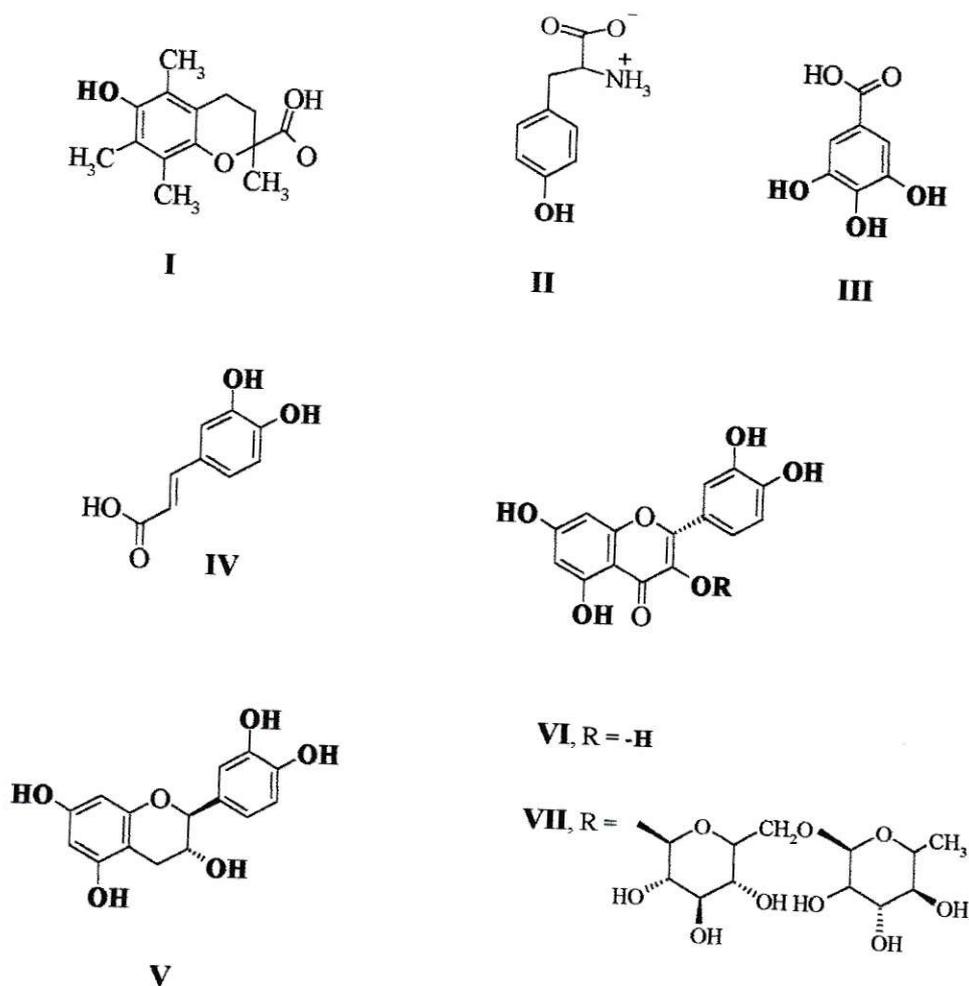


Figura 2.1.1. Estructura de los polifenoles empleados. **I:** Trolox, **II:** L-Tirosina, **III:** Ácido Gálico, **IV:** Ácido Caféico, **V:** Catequina, **VI:** Quercitina y **VII,** Rutina.

A partir del blanqueamiento del radical pre-formado se determina la CAO de cada compuesto, expresados como equivalentes de Trolox, esto es, referidos al consumo del radical catión que promueve una misma concentración de Trolox. Así se determinan los equivalentes que reaccionan en la etapa rápida (ERR) de la reacción y los equivalentes Totales (ERT) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$(\text{ERR})^0_{\text{fenol}} = \frac{[(\Delta^0 A)_{\text{Fenol}}]}{[(\Delta^0 A)_{\text{Trolox}}]} \frac{[\text{Trolox}]}{[\text{Fenol}]} \quad (2.1.1)$$

$$(\text{ERT})^0_{\text{vino}} = \frac{[(\Delta^0 A)_{\text{vino}}]}{[(\Delta^0 A)_{\text{Trolox}}]} \cdot f \cdot [\text{Trolox}] \quad (2.1.2)$$

$$(\text{ERR})^{15}_{\text{fenol}} = \frac{[(\Delta^{15} A)_{\text{Fenol}}]}{[(\Delta^{15} A)_{\text{Trolox}}]} \frac{[\text{Trolox}]}{[\text{Fenol}]} \quad (2.1.3)$$

$$(\text{ERT})^{15}_{\text{vino}} = \frac{[(\Delta^{15} A)_{\text{vino}}]}{[(\Delta^{15} A)_{\text{Trolox}}]} \cdot f \cdot [\text{Trolox}] \quad (2.1.4)$$

Donde, $\Delta^0 A$ es la disminución en la absorbancia medida a los 734 nm evaluada aproximadamente a los 10 segundos luego de la adición del aditivo y $\Delta^{15} A$ es la disminución de la absorbancia (a 734 nm) medida después de los 15 minutos de reacción y f corresponde a un factor de dilución de la muestra compleja.

Para determinar los equivalentes, como expresión de la CAO es necesario construir una curva de calibración para Trolox a fin de referir la medida a la estequiometría de éste compuesto. Esta es construida a partir de las distintas caídas en la absorbancia evaluada a los 734 nm, en función de distintas concentraciones de Trolox

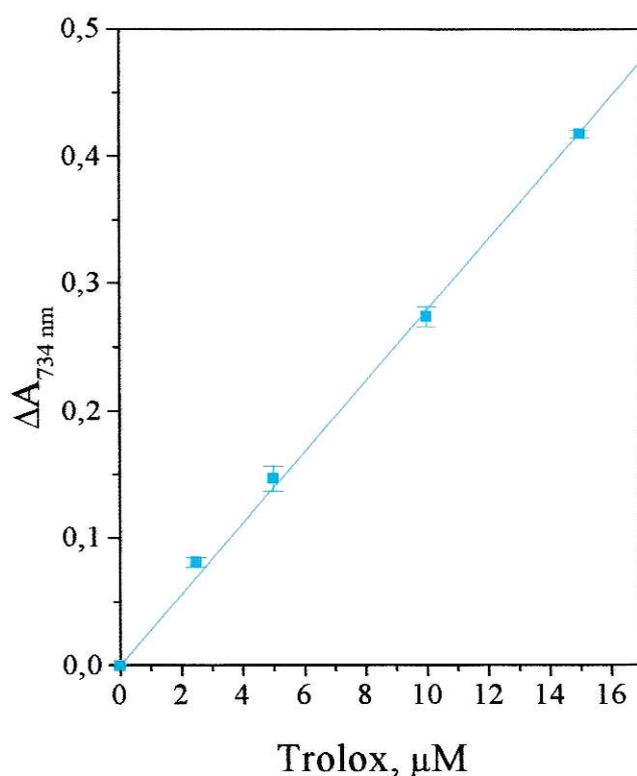
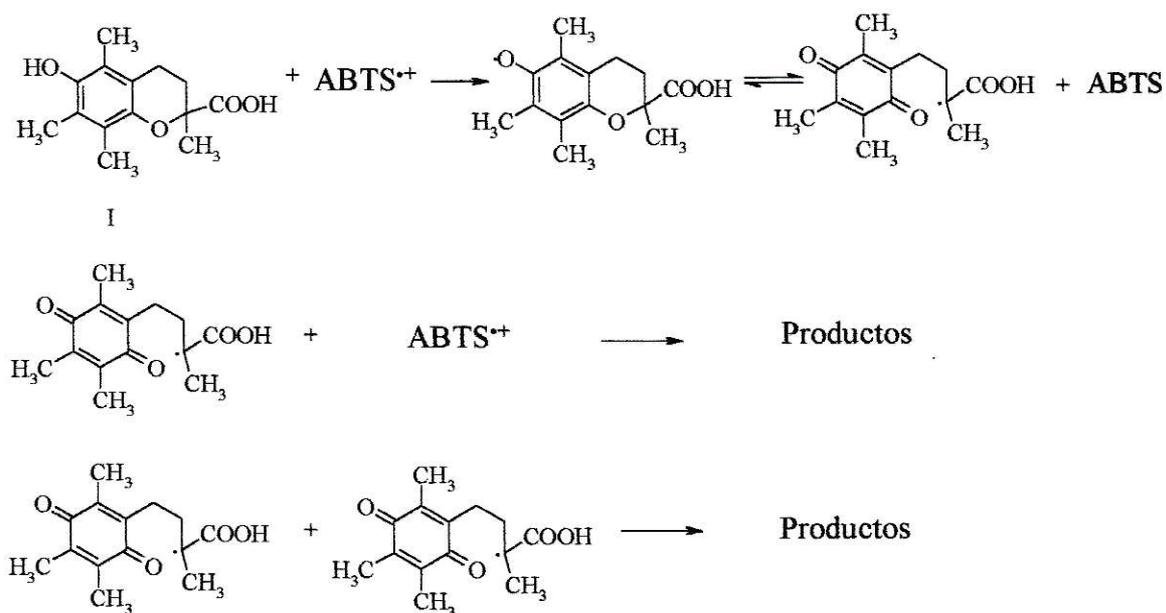


Figura 2.1.2. Curva de calibración, construida como cambios en la Absorbancia a los 734 nm en función de concentraciones crecientes de Trolox. Los valores indicados son un promedio de 3 determinaciones independientes.

Pendiente = 0.02792, n=5, r²=0.9994

2.1.3 RESULTADOS

La incorporación de Trolox utilizado como compuesto de referencia, provoca la decoloración instantánea del radical. A este compuesto le ha sido asociada una estequiometría 2, es decir 2 moléculas del radical catión derivado del ABTS son necesarias para consumir 1 molécula de Trolox. Este consumo se explica en términos de la abstracción del Hidrógeno hidroxílico (estructura I de la Figura 2.1.1) por un primer radical $ABTS^{*+}$ y el posterior compuesto de adición del radical derivado del Trolox, estabilizado en una estructura quinolinica, con un segundo radical derivado del ABTS, como se muestra en el Esquema 2.1.1.



Esquema 2.1.1. Mecanismo para la reacción entre el radical catión derivado del ABTS y Trolox

El primer paso de este mecanismo es coherente con la recuperación que se observa de la banda a los 340 nm, indicando la formación del ABTS precursor (Figura 2.1.3). Para la mayoría de los compuestos polifenólicos, el blanqueamiento del radical no es instantáneo, pero es casi completo luego de los 15 minutos de reacción. En este estudio fue evaluada la caída inicial media a los 10 s de la adición del sustrato y el blanqueamiento total medido a los 15 minutos de la reacción utilizando las expresiones 2.1.1-2.1.4

Perfiles característicos de consumo del radical derivado del ABTS se muestran en las Figuras 2.1.4 y 2.1.5 para las reacciones con Trolox y Tirosina; Quercitina, Acido Gálico, Acido Caféico, Catequina y Rutina, respectivamente.

En la figura 2.1.4 se puede observar que Trolox reacciona completamente en el tiempo de mezclado, mientras que la reacción con Tirosina muestra una cinética de consumo lenta y monotónica. En cambio todos los polifenoles empleados presentan una componente rápida y una lenta en los perfiles de consumo del radical. La mezcla compleja de polifenoles, como es el caso del vino, también presenta una conducta bifásica (Figura 2.1.6) en la cinética de consumo de radical catión.

Los deltas de absorbancia evaluados a los 10 segundos y a los tiempos finales 10-15 minutos para cada compuesto y mezclas complejas, están resumidos en la Tabla 2.1.1. La medida de los equivalentes en Trolox, ERR y ERT, fueron calculados utilizando las ecuaciones 2.1.1-2.1.4 y son presentadas en la Tabla 2.1.2.

También fueron calculadas las velocidades iniciales asociadas a los dos procesos que se distinguen en la cinética de consumo del radical catión (fase rápida y fase lenta),

promovido por los polifenoles. Para una mejor comprensión del significado de estos valores y a fin establecer una escala que facilite la comparación de los resultados, estas velocidades fueron normalizadas por el consumo de radical inducido por la concentración del polifenol agregada. Estos resultados están incluidos en la Tabla 2.1.3.

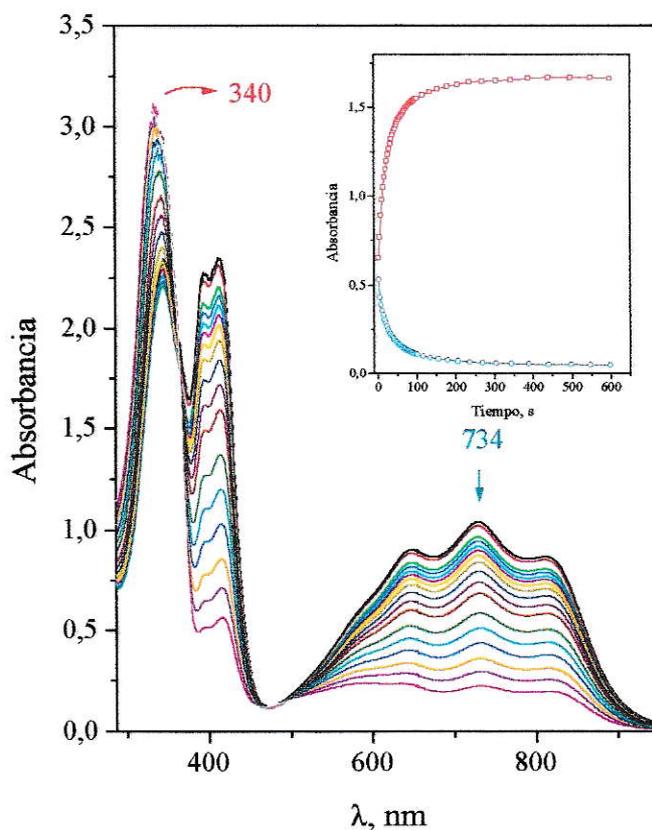


Figura 2.1.3. Cambios en el espectro del radical catión del ABTS inducido por 2.5 μM de Tirosina. Decrecimiento en las bandas ubicadas a longitudes de onda igual o superiores a los 390 nm (consumo del radical) y aumento de la banda a los 340 nm (formación de ABTS). Inserto: 340 nm (○); 734 nm (◻)



Aditivo	Concentración	ΔA^0	ΔA^{15}
Trolox	2.5 μM	0.418 $\pm 2.94 \times 10^{-3}$	-
Tirosina	2.5 μM	-	0.25 $\pm 9 \times 10^{-3}$
Acido Caféico	2.5 μM	0.072 $\pm 8.16 \times 10^{-4}$	0.155 $\pm 5.35 \times 10^{-3}$
Acido Gálico	2.5 μM	0.225 $\pm 12.7 \times 10^{-3}$	0.269 $\pm 3.68 \times 10^{-3}$
Catequina	2.5 μM	0.174 $\pm 18.2 \times 10^{-3}$	0.267 $\pm 5.31 \times 10^{-3}$
Rutina	1.9 μM	0.081 $\pm 16 \times 10^{-3}$	0.247 $\pm 1.41 \times 10^{-3}$
Quercitina	2.5 μM	0.192 $\pm 5.35 \times 10^{-3}$	0.398 $\pm 15.5 \times 10^{-3}$
Vino Tinto	$\sim 1 \mu\text{l}/3\text{ml}$	0.160 $\pm 18.7 \times 10^{-3}$	0.310 $\pm 9.9 \times 10^{-3}$
Vino Blanco	$\sim 10 \mu\text{l}/3\text{ml}$	0.228 $\pm 23.2 \times 10^{-3}$	0.389 $\pm 10 \times 10^{-3}$

Tabla 2.1.1. Resumen de las medias de caídas en el valor de la absorbancia del radical catión promovida por los distintos compuestos y mezclas complejas evaluadas.

Aditivo	ERR	ERT
Trolox	1.0	1.0
Tirosina	-	0.5
Acido Caféico	0.9	1.9
Acido Gálico	2.8	3.3
Catequina	3.1	3.3
Rutina	1.5	4.3
Quercitina	2.4	4.9
Vino Tinto	17500	34000
Vino Blanco	2500	4260

Tabla 2.1.2. Los valores ERR y ERT fueron calculados utilizando las expresiones 2.1.1-2.1.4 y representan la equivalencia en Trolox. Para los vinos, el número dado corresponde a la concentración mM de Trolox que produce el mismo efecto que la muestra de vino.

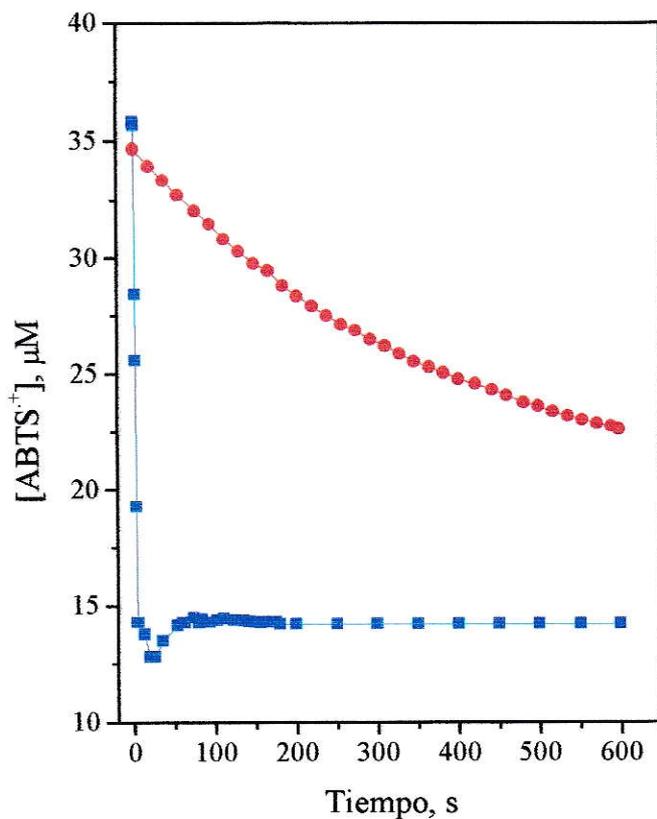


Figura 2.1.4. Disminución de la concentración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ después de la adición de $2,5 \mu\text{M}$ de Trolox (■) y de $2,5 \mu\text{M}$ Tirosina (●). La $[\text{ABTS}^{\bullet+}]$ es obtenida por la lectura A_{734} , utilizando un $\epsilon = 0.015 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

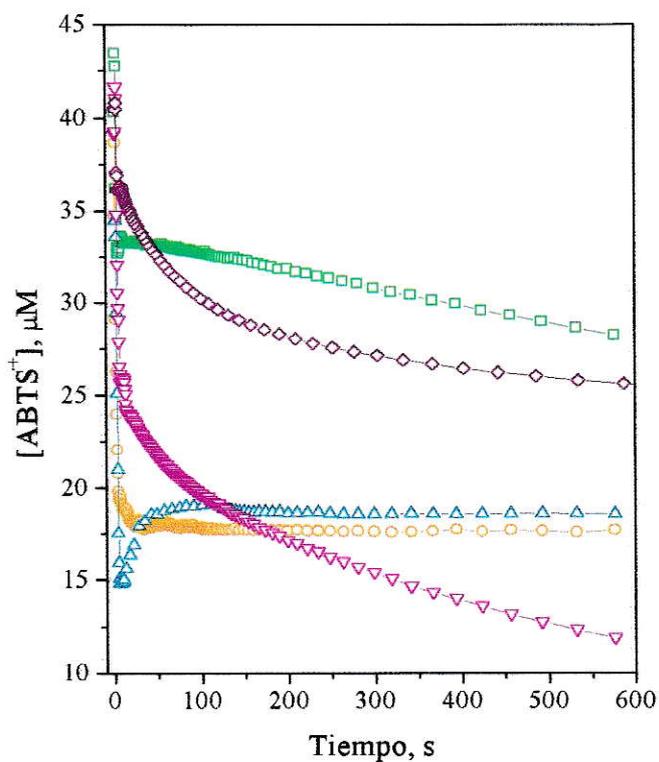


Figura 2.1.5. Disminución de la concentración del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ después de la adición de $2,5 \mu\text{M}$ de Ácido Caféico (□); de $2,5 \mu\text{M}$ Ácido Gálico (○); $2,5 \mu\text{M}$ de Catequina (△); $2,5 \mu\text{M}$ de Quercetina (▽) y $2,5 \mu\text{M}$ de Rutina (◇). La $[\text{ABTS}^{\bullet+}]$ es obtenida por la lectura A_{734} , utilizando un $\epsilon = 0.015 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

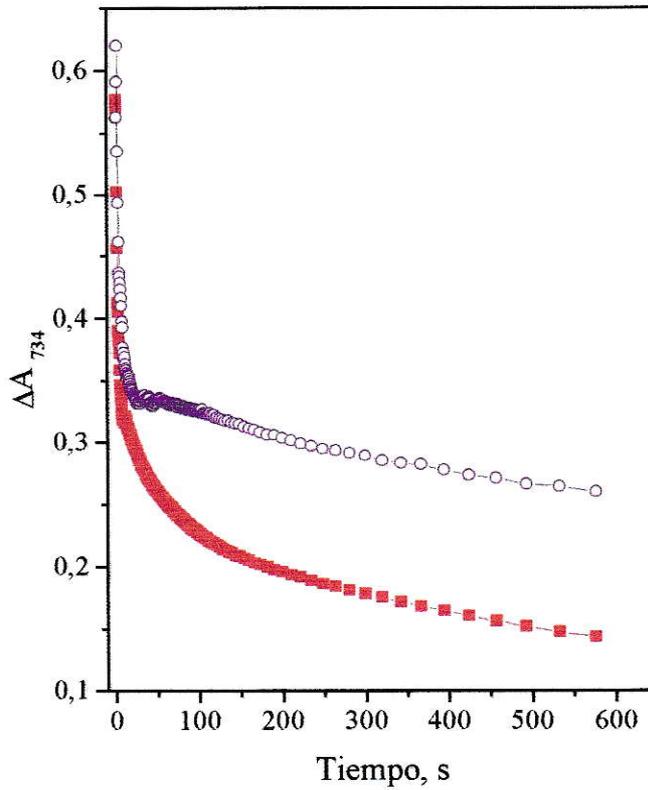


Figura 2.1.6. Disminución de la A_{734} después de la adición de 10 $\mu\text{l/ml}$ de Vino Blanco (■) y 1 $\mu\text{l/ml}$ Vino Tinto (○).

Compuesto	V_0^0 ($\mu\text{M/s}$)	$V_0^0/\Delta[\text{ABTS}^{\bullet+}]^0$	V_0^{15} ($\mu\text{M/s}$)	$V_0^{15}/\Delta[\text{ABTS}^{\bullet+}]^{15}$
Ácido Caféico	3.04 ± 0.77	0.63	$9.22 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}$	1.67×10^{-3}
Ácido Gálico	2.88 ± 0.66	0.19	$9.9 \times 10^{-3} \pm 4.3 \times 10^{-4}$	3.375×10^{-3}
Catequina	5.69 ± 0.46	0.49	$10.72 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-3}$	1.729×10^{-3}
Quercitina	3.68 ± 0.54	0.29	$133.65 \times 10^{-3} \pm 15.04 \times 10^{-4}$	9.73×10^{-3}
Rutina	1.90 ± 0.33	0.35	$106.56 \times 10^{-3} \pm 12.4 \times 10^{-3}$	9.62×10^{-3}
Vino Blanco	2.50 ± 0.47	0.16	$193 \times 10^{-3} \pm 70.5 \times 10^{-3}$	17.98×10^{-3}
Vino Tinto	2.44 ± 0.37	0.23	$18.8 \times 10^{-3} \pm 3.98 \times 10^{-3}$	1.88×10^{-3}

Tabla 2.1.3. Velocidades de consumo del radical catión para los polifenoles. Estas son obtenidas a partir de las pendientes iniciales de los gráficos $[\text{ABTS}^{\bullet+}]$ (μM) vs. Tiempo (s)

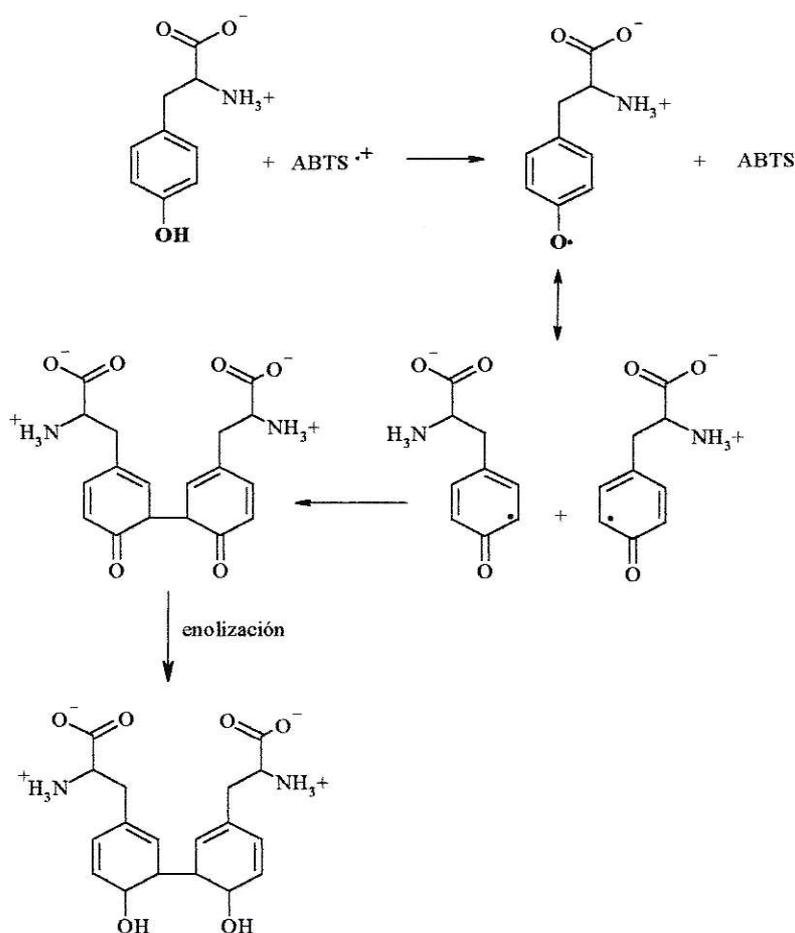
2.1.4 DISCUSION

Los valores de la Tabla 2.1.2 pueden ser relacionados con el número de centros reactivos de los compuestos estudiados. Los valores de ERT se correlacionan con el número de hidroxilos de cada una de las moléculas con un $r^2=0.949$, como se muestra en la Figura 2.1.7.

Así los índices ERR y ERT se presentan como una medida del número total de grupos fenólicos “titulables” en las distintas estructuras señaladas en la Figura 2.1.1. El primer índice, puede ser asociado con el número de grupos más reactivos dentro de la molécula y el índice evaluado en el período completo determinado a los 15 minutos, coincide con el número de centros reactivos totales que contiene cada una de las estructuras. El ácido Caféico, estructura IV de la Figura 2.1.1, presenta un índice ERT =1.9, coincidente con los dos centros a los cuales se le ha asociado su CAO, mientras que el ERR es 0.9, que puede ser entendido como que 1 de los 2 centros actuaría. El segundo grupo en el compuesto generado (probablemente un compuesto quinoidal) reaccionaría con el ABTS^{•+} en forma mucho más lenta.

La Tirosina, es la única estructura monofenólica evaluada y su comportamiento cinético es distinto al de los polifenoles y distinto de Trolox, el que también presenta un único H hidroxílico reactivo. El comportamiento monofásico que muestra la cinética de la Tirosina permite determinar solo el ERT, dado que no se distingue un consumo rápido en los primeros instantes de la reacción. Este comportamiento implica que el consumo del radical es muy lento comparado con Trolox y se observa que, aun a los 15 minutos, no es total. El número fraccionario también puede ser entendido en términos de que la

estequiometría de la reacción es exactamente la mitad de la exhibida por Trolox, a entender, la reacción de terminación (salida cruzada para dar productos no radicalarios) que compromete un radical catión del ABTS con un radical Tirosinil generado en el primer paso de abstracción del H, no sería una vía de terminación predominante, sino más bien la ocurrencia de reacciones entre radicales Tirosiniles (Esquema 2.1.2) como canal de terminación explicaría una estequiometría 1:1.



Esquema 2.1.2. Mecanismo para reacción entre el radical catión derivado del ABTS y Tirocina

El mecanismo de reacción indicado en este esquema, además implica la formación de di-Tirosina, un producto de oxidación de Tyr que se obtiene cuando es expuesta a una fuente de radicales libres [13].

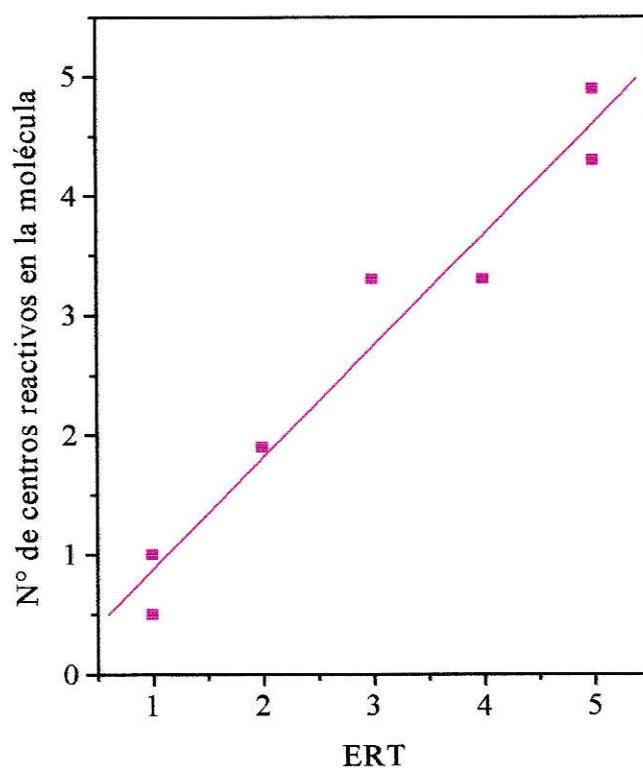
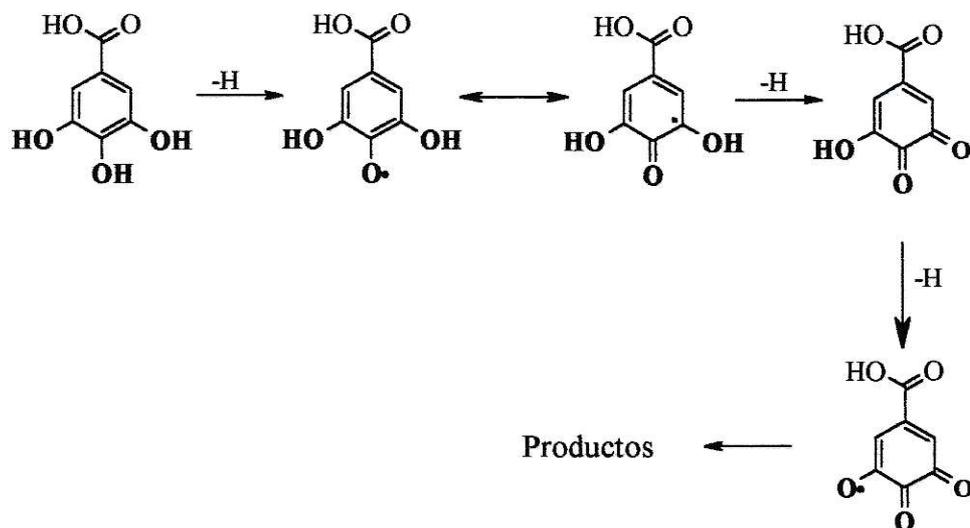


Figura 2.1.7. Correlación entre los valores ERT y el número de centros reactivos de las respectivas moléculas señaladas en el esquema 2.1. $r^2 = 0.949$, pendiente = 1.025 ± 0.106 , $n=7$

El Ácido Gálico, estructura **III** de la Figura 2.1.1, presenta un ERR= 2.8 y un ERT= 3.3, un posible mecanismo que representa las abstracciones de los H reactivos queda descrito en el siguiente esquema.



Esquema 2.1.2. Mecanismo propuesto para las abstracciones de H sucesivas en ácido Gálico

De acuerdo con los resultados, los hidrógenos hidroxílicos en las 3 posiciones, presentarían reactividades similares. Sin embargo, cabe señalar que el mecanismo propuesto aquí es irrelevante desde el punto de vista cinético, debido a que los hidrógenos son extraídos a partir de la estructura inicial y sólo se ha propuesto para mostrar la salida consecutiva de ellos.

Los polifenoles con 4 y 5 centros reactivos como Quercitina, Catequina y Rutina, tal como se espera, presentan un ERT coincidente con el número de centros reactivos.

Sin embargo, Catequina, estructura **IV** del Esquema 3.1.1 presenta un ERT de 3.3, esto se debe principalmente a que la reacción dentro del ciclo de 15 minutos no ha sido completa, lo que sugiere que la abstracción del último H es muy lenta y no termina de ser titulado por el método.

Las medidas en las mezclas complejas muestran que el vino tinto tiene aproximadamente 7 veces más antioxidantes que el vino blanco. Esta relación es válida tanto para los equivalentes que reaccionan en la etapa rápida como en la lenta (ERR y ERT). Esto implica que la reactividad promedio de los grupos fenólicos es similar para ambos tipos de vinos. Las diferencias entre los índices antioxidantes de ambos tipos de vinos se debe mas bien a la cantidad y no a la calidad de los antioxidantes presentes en estas preparaciones.

Así surge una pregunta natural a la hora de cuestionarse cuál de los dos índices que miden actividad antioxidante es más relevante al momento de caracterizar el comportamiento antioxidante de un compuesto. Probablemente no haya una sola respuesta a tal pregunta. Dependiendo de si el interés es proteger una muestra por un largo tiempo, período durante el cual serían consumidos los antioxidantes agregados, o si se quiere intentar preservar los antioxidantes de un sistema en condiciones de fuerte estrés oxidativo, el índice relacionado con la cantidad total de antioxidantes reactivos como el ERT podría ser el adecuado para elegir el antioxidante óptimo para este propósito. Pero si se está interesado en conocer en cómo una dada concentración de antioxidantes podría proteger a otras moléculas, entonces el índice relacionado con la reactividad (ERR) debería ser elegido. De esta manera, conocer ambos índices para

evaluar la capacidad antioxidante de una muestra, resulta apropiado porque permite distinguir cantidad (estequiometría) y factores de reactividad, ya que ambas informaciones son necesarias para conocer el valor y la extensión de la acción antioxidante.

En general, los valores de las velocidades que se informan en la Tabla 2.1.3 para la etapa rápida de la reacción pueden ser asociados con la velocidad del primer paso dentro de un esquema de reacción como el propuesto en el Capítulo I (Ecuaciones 1.2-1.4). Este involucra el proceso de deshidrogenación de los grupos más reactivos del polifenol y la consecuente formación del radical derivado, además de la concomitante reducción del radical catión para formar ABTS. Esta velocidad se suma la velocidad de la reacción inversa de éste proceso, siendo esta reacción inversa fuertemente dependiente de la estabilidad del radical derivado del polifenol. Así los valores de V_0^0 no permiten hacer una discriminación de un compuesto respecto de otro en términos de reactividad.

Dos sistemas que son interesantes de analizar son Quercetina y Rutina. Ambas estructuras difieren por el grupo R en posición 3 del anillo B (Figura 2.1.1). Los resultados claramente muestran que la reactividad del OH en esta posición (en el caso de la Quercetina) tendría una reactividad similar a los grupos fenólicos y vendría a sumarse a los 2 grupos reactivos “titulados” en la etapa rápida de la Rutina (ERR=1.5 y 2.4 para Rutina y Quercetina, respectivamente). En la Figura 2.1.5, se puede observar que la caída de la absorbancia en la etapa rápida, es mayor para Quercetina que para Rutina, en tanto los perfiles cinéticos de la etapa lenta pueden ser ajustados con una función

monoexponencial cuya pendiente inicial es casi la misma (9.73×10^{-3} y 9.62×10^{-3} para Quercetina y Rutina, respectivamente). Esta información sugiere que tanto el número de grupos reactivos “titulables” en la etapa lenta de la reacción (2,7-2,5) como las reactividades de los centros que participan en esta etapa, serían los mismos.

Una manera de distinguir más directamente la reactividad de los Hidrógenos comprometidos en los distintos compuestos individuales, se ha propuesto un estudio teórico-termodinámico a fin de comprender los índices de la Tabla 2.1.2

2.2.1 ESTUDIO TEORICO

Análisis global y local del mecanismo de deshidrogenación de polifenoles

Con el objeto de racionalizar estructuralmente el mecanismo de deshidrogenación de Acido Gálico, Acido Caféico, Catequina, Quercitina y Rutina descrito en la Sección 2.1.2, se propone aquí un estudio teórico acerca de los aspectos termodinámicos, y de reactividad global y local, en términos de propiedades que dependen de la energía y de la distribución de electrones en el sistema. Los aspectos termodinámicos se discuten en términos de la energía libre de formación de Gibbs. Esta cantidad se forma a partir de las entalpías o calores de formación de especies moleculares que se obtienen como *output* normal en casi todos los métodos semi-empíricos de la química cuántica. La entropía de formación de moléculas puede estimarse a partir del análisis vibracional que introduce a las constantes de fuerza o segundas derivadas de la energía con respecto a los $3N-6$ grados de libertad de los núcleos en la molécula. Estas derivadas se calculan rutinariamente en cualquier código computacional, y proveen los datos necesarios para construir funciones de partición electrónicas y vibracionales, las cuales permiten realizar un cálculo aproximado de la contribución entrópica a la energía libre (ver Apéndice I). La metodología utilizada en este trabajo es el código AM1, desarrollado por el grupo del Profesor Dewar [14]. Este código provee estructuras moleculares (geometrías) muy bien aproximadas a las

experimentales y calores de formación bastante confiables y comparables con los datos termoquímicos experimentales. Las funciones termodinámicas estimadas mediante esta metodología permiten establecer criterios de estabilidad relativa, entre las diferentes especies que se forman en el proceso de deshidrogenación sucesiva de los polifenoles involucrados en el presente estudio.

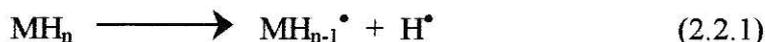
La reactividad local electrónica provee un cuadro conceptual adecuado para evaluar la localización regional de electrones en el sistema, en términos de cargas netas. El análisis termodinámico, asociado al cuadro de reactividad local se usará para dar soporte teórico al mecanismo de reacción propuesto para los procesos de deshidrogenación. Por ejemplo, la función de Fukui [15, 16] provee un criterio de reactividad local bastante simple y útil, que permite identificar los sitios más activos (sitios reactivos) en una molécula frente a una reacción específica. Se ha podido definir sin ambigüedad índices de Fukui apropiados para estudiar reactividad local para procesos nucleofílicos, electrofílicos y radicalarios [15, 16]. Estos últimos serán los utilizados en esta tesis para identificar aquellos centros más susceptibles frente al proceso de deshidrogenación homolítica en los polifenoles estudiados. Un valor alto de este índice en un centro atómico será interpretado aquí como una probabilidad que la deshidrogenación ocurra preferentemente en ese sitio. Esto permite establecer una escala de susceptibilidades que proporcionará un modelo para abstraer selectivamente los diferentes átomos de hidrógeno hidroxílicos presentes en los polifenoles. Una vez que se obtiene esta escala relativa basada en los índices de Fukui radicales, se procede a deshidrogenar selectivamente cada molécula, para realizar posteriormente el análisis

termodinámico de estabilidades relativas en las diferentes especies moleculares generadas en los procesos de deshidrogenación. Es importante enfatizar que los índices locales de reactividad se relacionan preferentemente con la reactividad referida a los productos de control cinético, dentro de un modelo perturbativo que se desarrolla en torno a valores pequeños de la coordenada de reacción, y que por lo tanto están directamente relacionados con potenciales de *activación*. Estos potenciales de activación se relacionan exponencialmente con las constantes de velocidad dentro del modelo de Arrhenius, de modo que dan una idea adecuada de los aspectos cinéticos de las reacciones químicas [17, 18].

2.2.2 Aspectos energéticos.

Para aliviar la notación en esta Sección, los polifenoles serán representados como especies MH_n , para enfatizar la presencia de n potenciales átomos de hidrógeno que se pueden disociar homolíticamente de un esqueleto común M en la molécula de referencia MH_n . Estas corresponden a las estructuras que se despliegan en la Figura 2.1.1. Ellas corresponden a ácido gálico (III), ácido caféico (IV), catequina (V) y quercetina (VI) y serán consideradas como sistemas modelo para describir el proceso de deshidrogenación en polifenoles, dentro del modelo teórico descrito.

Para la primera deshidrogenación de MH_n se tiene, de acuerdo al esquema 2.1.2, la siguiente reacción:



En el proceso descrito en la ecuación (2.2.1), la especie MH_{n-1}^\bullet corresponde a un intermediario relajado nuclearmente, que se obtiene de la primera deshidrogenación de la especie MH_n . Es interesante notar que en el proceso de deshidrogenación sucesiva, se formaran cíclicamente especies que cambian su multiplicidad de espín desde un estado singulete de capa cerrada a uno doblete de capa abierta. Notar que en cada paso de deshidrogenación se forma además un átomo de hidrógeno radical el cual contribuirá con un termino constante Δg° a la energía libre de formación de cada producto intermediario, y corresponde a la energía libre de formación de un átomo de hidrógeno radical no ligado, formado a partir de la disociación homolítica de una molécula de hidrógeno en su estado fundamental.

Para la segunda y siguiente deshidrogenaciones las correspondientes entalpías se describen del mismo modo. El análisis vibracional provee estimaciones del término entrópico $T\Delta S^\circ$, a partir del cual se construyen las energías libres de formación mediante la ecuación:

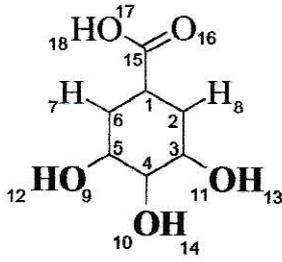
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (2.2.2)$$

Estas cantidades se obtienen directamente del análisis vibracional que se realiza automáticamente en el código AM1, a partir del análisis de la matriz de segunda derivadas como se describe en el Apéndice I.

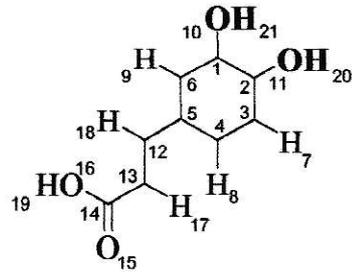
2.2.3 Detalles Computacionales.

Como se mencionó anteriormente, todos los cálculos de estructura electrónica, energías y análisis vibracional fueron realizados utilizando el código semi-empírico AM1. Esta metodología resuelve la ecuación de Schrödinger utilizando solo los electrones de valencia. Además de calcular los calores de formación y las entropías de formación, el método AM1 provee un análisis de población electrónica y de espín, para el caso de espín no restringido en sistemas de capa abierta. Las energías monoeléctricas de los orbitales de frontera HOMO y LUMO son utilizadas para estimar la blandura S , que se define como el recíproco del *gap* HOMO-LUMO. Las funciones de Fukui radicalarias se obtienen como un promedio entre las densidades electrónicas de los orbitales de frontera, y sus contrapartes regionales condensadas a átomos se obtienen en términos de los coeficientes de los orbitales HOMO y LUMO y de la matriz de recubrimiento entre los orbitales atómicos involucrados en ellos [16].

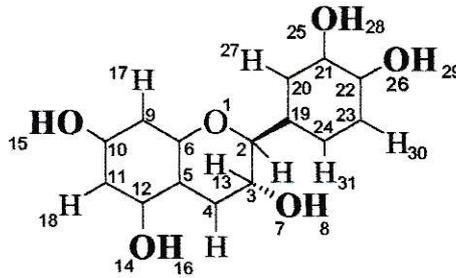
(Apéndice II)



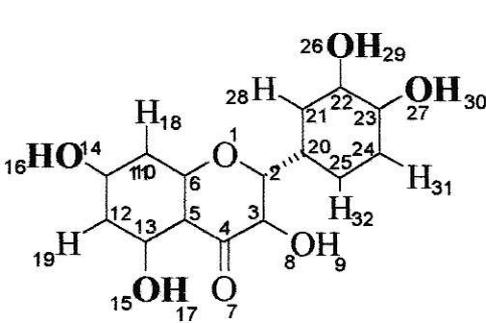
III



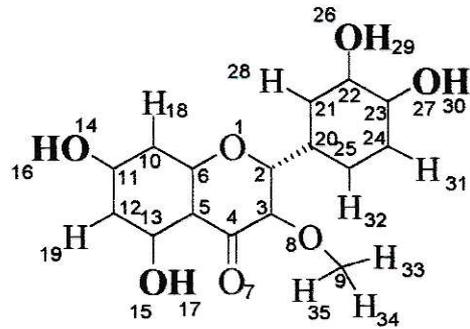
IV



V



VI



VII

Figura 2.2.1 Numeración empleada para las estructuras analizadas. III: Acido Gálico; IV: ácido Caféico; V: catequina, VI Quercetina y VII: pseudo-Rutina (Quercetina metilada en O8)

2.2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estimar las cantidades ΔG_i de formación; $i = 1, 2, \dots, n$, se calculan las correspondientes entalpías y entropías de formación de todas las especies involucradas en cada proceso de deshidrogenación, utilizando la metodología AM1, que provee valores confiables de calores de formación [14]. Por ejemplo, el calor de formación calculado para el átomo de hidrógeno radical es 52,1 kcal/mol, valor que se compara bastante bien con la entalpía de formación experimental estimada a partir de la energía de disociación de una molécula de hidrógeno H_2 que es aproximadamente 54.5 kcal/mol [19]. Con las entalpías de deshidrogenación y las correspondiente entropías de formación a mano se procede a determinar la energía libre de deshidrogenación a partir de la ecuación (2.2.2). Sin embargo, previo al estudio termodinámico, se debe determinar una escala relativa de labilidad de los potenciales átomos de hidrógeno salientes sobre la base de las funciones de Fukui radicales condensadas a átomos. Estos índices locales se muestran en la Tabla 2.2.1 para los sistemas **III** y **IV** y en la Tabla 2.2.2 para los sistemas **V**, **VI** y **VII** descritos en la Figura 2.2.1, que contiene la numeración de los centros atómicos citados en cada Tabla. El ácido gálico contiene 3 sitios potenciales de deshidrogenación de los grupos hidroxílicos unidos al anillo en las posiciones *-meta* (2) y *-para* (1). Un cuarto sitio de deshidrogenación es el átomo de oxígeno carboxílico. Aun cuando los datos experimentales sugieren que este centro es

inactivo frente al proceso de deshidrogenación, descrito como proceso fundamental para justificar las propiedades antioxidantes de los polifenoles aquí utilizados, se incluirá con el único propósito de validar el modelo basado en la función de Fukui. Por otra parte, el ácido caféico presenta 2 sitios potenciales de deshidrogenación, a saber, los dos átomos de oxígeno del grupo hidroxilo ligados al anillo, y un tercer sitio presente en el grupo carboxílico unido el grupo etileno que se encuentra ligado al anillo en la posición 1, como se muestra en la Figura 2.2.1. La Tabla 2.2.1 contiene el análisis local basado en la función de Fukui y las blanduras locales regionales (s_k). Este último índice se obtiene simplemente al multiplicar la función de Fukui en el sitio k , por la blandura global S de la molécula, a saber $s_k^\bullet = f_k^\bullet S$. Ambos índices miden formalmente la polarizabilidad electrónica o de espín en el sitio, y representan un criterio físico confiable para asignar sitios activos en una molécula [20,21].

Molécula	Sitio (k)	f_k^\bullet	$s_k^\bullet = f_k^\bullet S$
Acido Gálico	O9	0.0356	0.2229
	O10	0.0514	0.3218
	O11	0.0433	0.2711
	O17	0.0087	0.0545
Acido Caféico	O10	0.0294	0.1967
	O11	0.0648	0.4335
	O16	0.0061	0.0409

Tabla 2.2.1 Funciones de Fukui regionales y blanduras locales para los estados fundamentales (MH_n) de Acido Gálico (III) y Acido Caféico (IV) ^{a)}.

- a) Los valores de la blandura global S son 6.26 y 6.69 unidades atómicas para ácido gálico y ácido caféico, respectivamente. Valores obtenidos a partir de cálculos AM1. Para identificar la numeración de cada centro, ver Figura 2.2.2.

Molécula	Sitio (k)	f_k^\bullet	$s_k^\bullet = f_k^\bullet S$
Catequina	O26	0.0425	0.2622
	O25	0.0663	0.4091
	O14	0.0058	0.0358
	O13	0.0062	0.0383
	O7	0.0002	0.0013
Quercetina	O26	0.0160	0.1123
	O27	0.0397	0.2786
	O14	0.0073	0.0513
	O15	0.0085	0.0597
	O8	0.0407	0.2857
Rutina	O26	0.0201	0.1387
	O27	0.0479	0.3301
	O15	0.0003	0.0021
	O14	0.0069	0.0476
	O8	0.0214	0.14766

Tabla 2.2.2 Funciones de Fukui regionales y blanduras locales para los estados fundamentales (MXn) de Catequina (V) y Quercetina (VI) y Rutina (VII) ^{a)}.

^{a)} Los valores de blandura global S son de 6.17, 7.02 y 6.90 unidades atómicas para catequina, quercetina, y rutina, respectivamente. Valores obtenidos a partir de cálculos AM1. Para identificar la numeración de cada centro, ver Figura 2.2.2.

2.2.5 Aspectos locales. Escala de labilidad



A partir de la Tabla 2.2.1 se puede observar en primer lugar que las blanduras globales de ácido gálico (6.26 u.a.) y ácido caféico (6.69 u.a) caen dentro de un rango de pequeña variación (aproximadamente 6.6% con respecto al valor promedio de 6.5 u.a.). De acuerdo con los criterios cualitativos de reactividad química, especies que presentan propiedades globales como dureza química y blandura global similares, despliegan reactividades globales similares. Esta regla empírica propuesta por Li y Evans [22] y confirmada en estudios posteriores [23] esta basada en el principio de ácidos y bases duros y blandos (HSAB) de Pearson [24]. Esto significa que frente a un proceso de deshidrogenación homolítica, ambas moléculas deberían responder globalmente de un modo similar. Notar que en el caso de Quercetina y Rutina la similaridad en cuanto a sus respectivas reactividades globales es aun mas evidente, como se desprende de la comparación de sus blanduras globales, cuya diferencia es la mínima de la serie. Sin embargo, la información más relevante la provee el análisis local basado en las funciones de Fukui radicalarias y las blanduras locales en los potenciales sitios de deshidrogenación. Por ejemplo, en ácido gálico (Estructura III en la Figura 2.2.2), ambos índices predicen el siguiente orden de deshidrogenación: $O10 > O9, O11 \gg O17$. De acuerdo con el modelo aquí propuesto, el primer hidrógeno en salir, en un proceso de deshidrogenación no concertado, sería el átomo de hidrógeno ligado al átomo de Oxígeno 10, que se encuentra en la posición *-para* con respecto al grupo carboxilato unidos al anillo aromático. Los dos átomos de hidrógeno restantes disponibles para un

segundo proceso de desdhidrogencion son aquellos unidos a los centros O9 y O11. Estos centros que pudieran ser considerados en principio como sitios activos equivalentes muestran sin embargo un orden de labilidad, a saber, $O11 > O9$. Esta asimetría puede atribuirse al entorno lejano introducido por el grupo carboxilato, el cual deja al sitio O11 con un entorno químico sensiblemente diferente a aquel del sitio O9 (un grupo hidroxilo en el plano molecular que coincide con el del sistema π del anillo en el primer caso, y un grupo carbonilo en el mismo plano en el segundo caso, ver Figura 2.2.1). Este efecto de largo alcance puede probablemente deberse a una interacción a través del enlace que se propaga a través del sistema aromático. Los datos resumidos en la Tabla 2.2.1 también sugieren una escasa actividad del hidrogeno carboxilico en un proceso de homólisis, debido a que tanto la función de Fukui en el sitio como la blandura local despliegan valores que son un orden de magnitud menor en ese sitio en ambos casos. Es importante destacar que se esta analizando la actividad local con respecto a un proceso en que el átomo de hidrógeno saliente queda en un estado de átomo radical y es *respecto de este proceso* que este átomo se muestra como una especie inactiva. En efecto, con referencia por ejemplo a un proceso diferente como un equilibrio acido-base este átomo de hidrógeno se esperaría ciertamente mas activo que los restantes.

También incluidas en la Tabla 2.2.1 están las funciones de Fukui radicalarias y las correspondientes blanduras locales en los sitios potenciales de deshidrogenación para ácido caféico. El orden de labilidad establecido con el presente modelo es el siguiente: $O11 > O10 \gg O16$. En este caso se predice que el primer sitio de deshidrogenación

sería el átomo O11, seguido del hidrógeno unido al átomo de oxígeno O19. La probabilidad de deshidrogenación radicalarias del sitio O16, correspondiente a una función ácida, se predice claramente baja. La escala de labilidad en los procesos de deshidrogenación de estos sistemas será usada mas adelante para proponer un protocolo de deshidrogenación que permitirá modelar los aspectos termodinámicos de estos procesos.

La Tabla 2.2.2 contiene la misma información para Catequina (V), Quercetina (VI) y Rutina (VII). El análisis local basado en la función de Fukui radicalarias y las correspondientes blanduras locales en Catequina sugieren el siguiente orden de deshidrogenación: O25 > O26 >> O13, O14 >>> O7. Este resultado sugiere que los centros O25 y O26 (en ese orden) tienen una gran probabilidad de sufrir una deshidrogenación radicalaria. La salida de los dos siguiente átomos radicales de hidrógeno muestran una clara y aproximadamente equivalente menor probabilidad de disociarse homolíticamente de la especie MH_{n-2} . Se debe destacar que la especie MH_{n-2} es nuevamente un sistema de capa cerrada y por lo tanto con una estabilidad termodinámica relativa mayor que una especie radical. Este aspecto será considerado más adelante en el análisis de estabildades relativas. Este análisis local también predice que el átomo de hidrógeno ligado al sitio O7 mostrará una baja actividad frente a un proceso de deshidrogenación homolítica.

La molécula de Quercetina exhibe un cuadro local consistente con tres probables sitios activos para una potencial deshidrogenación. En efecto, los sitios O27 y O8 muestran valores máximos de la función de Fukui y blanduras locales radicalarias,

mientras que el centro O26 muestra una susceptibilidad menor. Los sitios O14 y O15 por otra parte se predicen con una escasa probabilidad de sufrir una ruptura homolítica con el átomo de hidrógeno ligado a estos centros. La molécula de Rutina (VII) agrega al análisis local un aspecto adicional bastante interesante, en el sentido que este sistema se puede obtener por el reemplazo del átomo de hidrógeno ligado al sitio O8, por un grupo metilo. Esta sustitución química inhibe completamente la actividad radicalaria en este sitio que resulta ser el sitio de mayor actividad en Quercetina. Además de la inhibición de este sitio, es interesante notar las respuestas a la sustitución química en los sitios O26, O27, O14 y O15. La comparación de las respectivas blanduras locales radicalarias en Quercetina y Rutina, revela una significativa activación de estos centros inducidas por el bloqueo en la posición O8. Este incremento en la reactividad local radicalaria puede ser interpretado como una *activación de sitios* inducida por el efecto de sustituyente. Notar sin embargo que esta activación en los centros O14 y O15 no cambia significativamente sus susceptibilidades radicalarias originales en Quercetina, de modo que en general, el análisis local predice dos sitios activos para actividad homolítica en Rutina. Otro aspecto interesante de enfatizar, es la pequeña diferencia en blandura global en Quercetina y Rutina, que de acuerdo con la regla de reactividad global de Li-Evans indicaría que la mayor similitud en las respectivas reactividades globales radicalarias se debería de observar en el par (Rutina, Quercetina). Este aspecto será considerado en el análisis termodinámico que complementa el estudio global y local en esta serie de moléculas.

2.2.6 Análisis termodinámico. Estabilidades relativas.

A partir de los resultados del análisis local, es posible identificar los centros más lábiles para los procesos de deshidrogenación en polifenoles, de acuerdo a un criterio de probabilidad establecido a partir de la función de Fukui radicalaria. Esta información es también útil para realizar un análisis termodinámico completo y establecer criterios de estabilidad relativa entre las diferentes especies involucradas en los procesos de deshidrogenación. La primera pregunta que se puede hacer con respecto a estos procesos, es si la deshidrogenación es un proceso concertado (todos los hidrógenos potencialmente activos para un proceso de ruptura homolítica salen simultáneamente desde el esqueleto común M) o lo hacen secuencialmente siguiendo algún orden preferencial. De acuerdo al modelo local que se relaciona principalmente con los productos de control cinético, en ninguno de los sistemas estudiados se predice una deshidrogenación concertada. Esta predicción se basa simplemente que en ese caso hipotético, los diferentes sitios activos deberían mostrar igual probabilidad de deshidrogenación homolítica sobre la base del criterio de la función de Fukui. Sin embargo, este análisis sugiere un proceso no concertado, en que algunos sitios aparecen claramente privilegiados con respecto a otros. Esta predicción puede ser probada haciendo adicionalmente un análisis termodinámico acerca de las estabilidades relativas de los intermediarios que se forman en un proceso secuencial de deshidrogenación. El

análisis termodinámico muestra inmediatamente que la salida concertada de los hidrógenos presentes en los polifenoles que se analizan es completamente desfavorable, si se considera que los calores de formación y las energías libres de formación de las especies M^\bullet corresponden en general a sistemas no ligados (es decir, con entalpías y energías libres de formación positivas). Este resultados es consistente con el análisis local y también con los índices ERR ERT discutida en la primera parte de esta tesis, en que el numero de átomos de hidrógeno titulables en general no coincide con el numero de átomos de hidrógeno potencialmente activos en el proceso de homólisis, sugiriendo una deshidrogenación secuencial. En este sentido, los resultados locales pueden además ser utilizados para modelar este proceso secuencial en que el orden en que se generen las diferentes especies debe ser consistente con las energías libres de formación de cada una de las especies intermediarias de estos procesos.

Se presentan en esta Sección los resultados de este análisis para relacionarlo al final de la discusión, con la información obtenida a partir del análisis mediante índices de reactividad, y principalmente con alguno de los índices experimentales descritos en la primera parte de este Capítulo

La Tabla 2.2.3 resume los resultados para las entalpías, energías libres y entropías de formación para ácido gálico, ácido caféico y los intermediarios deshidrogenados para ambas especies. De acuerdo al protocolo sugerido por el análisis local, se procedió a sacar el primer hidrógeno ligado al sitio O10 para generar las especies radicales MH_3^\bullet y H^\bullet de acuerdo al esquema descrito en la ecuación (2.2.1). Se siguió el procedimiento retirando los siguientes átomos de hidrógeno unidos a los sitios

O11, O9 y O17, en ese orden. Los resultados condensados en la primera mitad de la Tabla 2.2.1 muestran en primer lugar, que la entropía de formación agrega contribuciones prácticamente constantes a la energía libre de formación en el estado fundamental MH_4 y en todos los intermediarios deshidrogenados. Esto implica que las especies intermediarias en ácido gálico son todas termodinámicamente estables, excepto la especie M que resulta ser un estado no ligado con energías de unión positivas. Se deduce además que los respectivos procesos de formación en las tres primeras deshidrogenaciones son controlados térmicamente (control entálpico). Es interesante notar la coherencia que se puede adelantar entre el análisis local desarrollado en torno a las funciones de Fukui radicalarias y blanduras locales, en el sentido que el cuarto átomo de hidrógeno presente en el grupo carboxilato, que se predice de escasa actividad en el proceso de homólisis, no es un estado estacionario en la superficie de energía potencial. Ambos análisis, el local y termodinámico son también consistentes con el índice ERR que se muestra en la Tabla 2.1.2 en que Acido Gálico presenta un valor $ERR = 2.8$, consistente con tres centros activos para la homólisis secuencial: el análisis local predice tres hidrógenos con blanduras locales radicalarias relevantes en los centros O9, O10 y O11, mientras que el análisis termodinámico predice que los intermediarios formados MH_3^* , MH_2 y MH^* tendrán energías libres de formación negativas. El análisis térmico es también consistente con la predicción hecha sobre la base del índice ERT que se relaciona principalmente con los productos de control termodinámico. En efecto, el valor $ERT = 3.3$ es también consistente con tres átomos de hidrógenos lábiles en ácido gálico,

lo que indica claramente que el átomo de hidrógeno unido al grupo carboxilato no es activo para un proceso de deshidrogenación radicalaria.

Para ácido caféico, se calcularon las entalpías entropías y energías libres de formación mediante un procedimiento similar al anterior, sacando esta vez en primer lugar el átomo de hidrógeno ligado al sitio O11, seguido de los átomos de hidrógeno unidos a los sitios O10 y O16, en ese orden. Se genera en primer lugar dos especies radicales MH_2^\bullet y H^\bullet . Es interesante notar nuevamente que las entropías de formación tienen un valor prácticamente constante, similar al patrón desplegado por las entropías de formación en ácido gálico. Esto permite concluir que en ambos sistemas el proceso de deshidrogenación es controlado térmicamente. Notar sin embargo, que la salida del tercer hidrógeno unido al sitio O16 conduce a un producto con una energía libre ligeramente positiva ((13.2 Kcal/mol). Este resultado implica además una entropía negativa para el proceso de formación de esta especie, la que se predice como inestable de acuerdo a los criterios de estabilidad de Gibbs ($\Delta G^\circ < 0$; $T\Delta S^\circ > 0$). Nuevamente se encuentra consistencia entre este resultado y aquel derivado del análisis local, en el sentido que la tercera deshidrogenación en ácido caféico se predice con una escasa probabilidad (ver Tabla 2.2.1). El análisis local predice un átomo de hidrógeno (aquel ligado al centro O11) marcadamente activo con respecto a los restantes con una blandura local radicalaria de 0.4335 en Acido Caféico. Este resultado es consistente con el valor $ERR = 0.9$ descrito en la Tabla 3.1.2. Notar sin embargo, que el índice $ERT = 1.9$, relacionado con los productos de control termodinámico es consistente con dos átomos de hidrógeno activos en el proceso de homólisis. Este resultado es normal en el sentido

que el análisis con índices de reactividad es consistente con los productos de control cinético para el cual la blandura local radicalaria produce respuestas consistentes con el índice ERR, mientras que el índice ERT, se relaciona coherentemente con los resultados del análisis termodinámico, en el sentido que las dos especies intermediarias generadas en las dos primeras deshidrogenaciones conducen a especies termodinámicamente estables ($\Delta G_0 < 0$, ver Tabla 2.2.3)

Molécula	Especie	ΔH_f°	ΔG_f°	T ΔS_f°
<i>Acido Gálico</i>	MH ₄	-109.8	-140.6	30.8
	MH ₃ [•]	-94.6	-125.3	30.7
	MH ₂	-76.8	-105.8	29.0
	MH [•]	-66.3	-95.6	29.3
	M ^{b)}	NC	NC	NC
<i>Acido Caféico</i>	MH ₃	-33.3	-66.6	33.3
	MH ₂ [•]	-17.9	-51.4	33.3
	MH	-2.8	-34.1	31.3
	M [•]	45.8	13.2	-32.6

Tabla 2.2.3 Funciones termodinámicas estándares de formación para Acido Gálico (III), Acido Caféico (IV) y sus productos intermedarios en procesos de deshidrogenación sucesiva. ^{a)}

a) *Todas las funciones termodinamicas estándares de formación en unidades de Kcal/mol. T = 298.5 K . b) NC: La molécula no converge a un punto estacionario de la superficie de energía. Se presume un estado no ligado con energías positivas.*

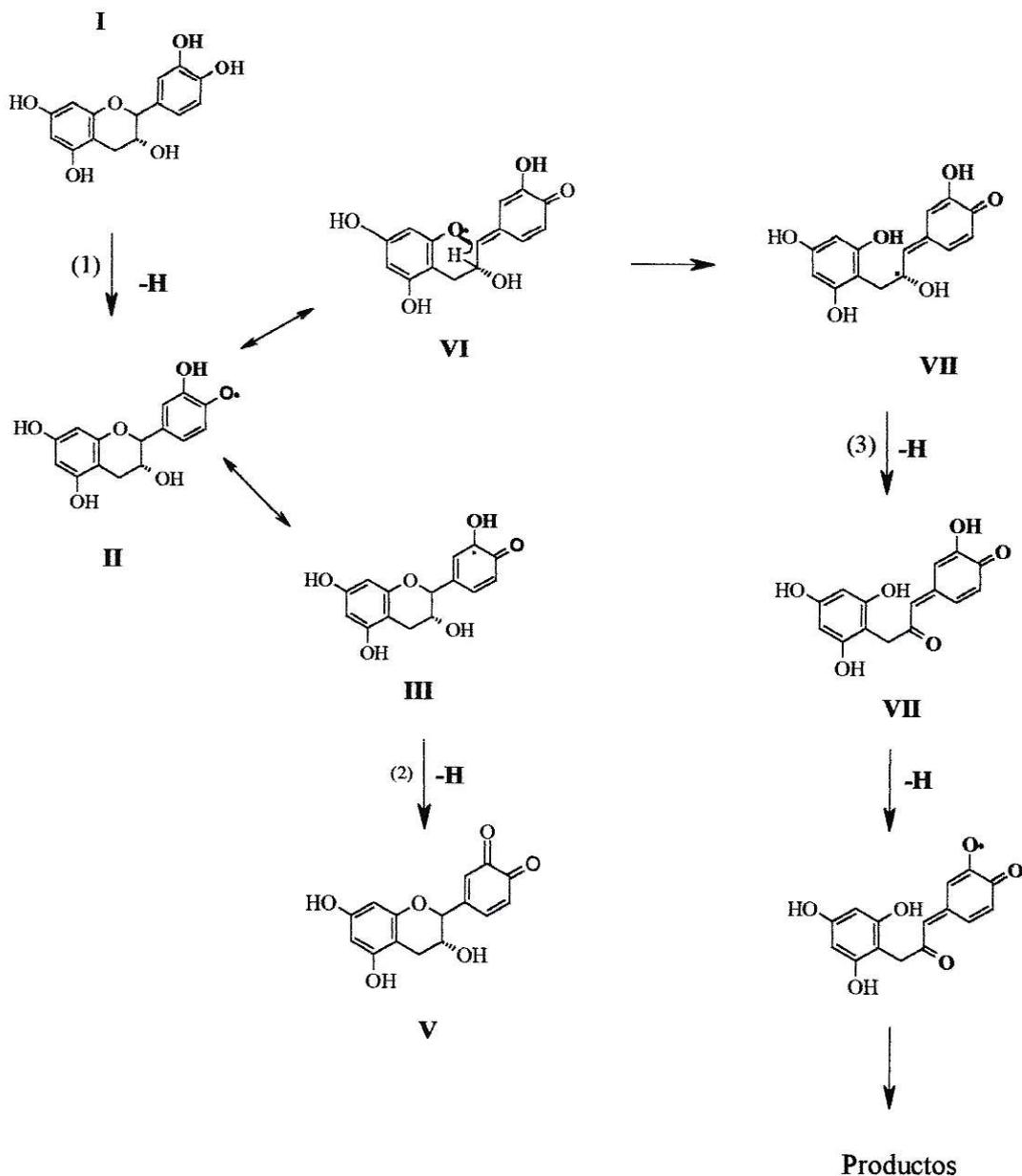
Molécula	Especie	ΔH_f^o	ΔG_f^o	T ΔS_f^o
Catequina	MH ₅	-23.9	-65.9	42.0
	MH ₄ [•]	-7.2	-49.1	41.9
	MH ₃	20.8	-21.5	42.3
	MH ₂ [•]	87.7	45.7	-42.0
	MH	>0	>0	<0
	M [•]	>0	>0	<0
Quercetina	MH ₅	-47.3	-89.3	42.0
	MH ₄ [•]	-36.8	-79.5	42.7
	MH ₃	-13.8	-55.4	41.6
	MH ₂ [•]	19.6	-20.2	<0
	MH	19.6	-20.2	<0
	M [•]	>0	>0	<0
Rutina	MH ₄	-18.6	-63.0	44.4
	MH ₃	-3.2	-47.4	44.2
	MH ₂	11.8	-32.6	44.4
	MH	>0	>0	<0
	MH	>0	>0	<0
	M	>0	>0	<0

Tabla 2.2.4 Funciones termodinámicas estándares de formación para Catequina (III), Quercetina (VI) y Rutina (VII) y sus productos intermedarios en procesos de deshidrogenación sucesiva. ^{a)}

^{a)} Todas las funciones termodinámicas estándares de formación en unidades de Kcal/mol. T = 298.5 K.

Los resultados del análisis termodinámico para Catequina, Quercetina y Rutina se presentan en la Tabla 2.2.4. Para Catequina se consideraron nuevamente todos los átomos de hidrógeno hidroxílicos como potenciales centros de deshidrogenación homolítica *a priori* con el único propósito de evaluar la consistencia entre el análisis local y el térmico. De acuerdo al modelo local se procedió a remover el átomo de hidrógeno ligado al centro O25 para generar las especies radicales MH_4^\bullet y H^\bullet . Los dos primeros átomos radicales de hidrógeno salen dando lugar a especies estables ($\Delta G^\circ < 0$; $T\Delta S^\circ > 0$). Se debe destacar que la salida del segundo átomo radical H^\bullet es solo permitida por entropía, ya que térmicamente, en términos de la entalpía de formación del producto MH_3 se predice inestable (Sin embargo, la salida del tercer átomo de hidrógeno conduce a un intermediario inestable ($\Delta G^\circ > 0$)).

A pesar que la salida del tercer átomo de hidrógeno conduce a intermediarios inestables termodinámicamente ($\Delta G^\circ < 0$; $T\Delta S^\circ > 0$) se puede encontrar concordancia entre el índice $ERR = 3.1$ para Catequina y el análisis local, si se considera el siguiente mecanismo propuesto para la deshidrogenación de Catequina:



Esquema 2.2.1 Mecanismo de reacción propuesto para las deshidrogenaciones consecutivas de Catequina a partir del análisis de las Funciones de Fukui de la Tabla 2.2.5.

El esquema de reacción descrito en el Esquema 2.2.1. postula a los procesos (1) y (2) como las etapas consecutivas de las deshidrogenaciones en los sitios O25 y O26 según lo sugieren los valores de las funciones de Fukui en estos sitios (Tabla 2.2.5.). La estructura (II) del Esquema 2.2.1, puede dar origen a una especie resonante (VI) que sufriría un reordenamiento descrito como una transferencia de H intramolecular desde C3 hacia el O1 (Producto VI). Este tipo de reacciones es bien conocida en fotoquímica de cetonas, llamadas fragmentaciones de Norrich tipo II [25]. El reordenamiento de H *activa* un nuevo sitio, a saber el centro O7 en la estructura VII que se muestra a continuación:

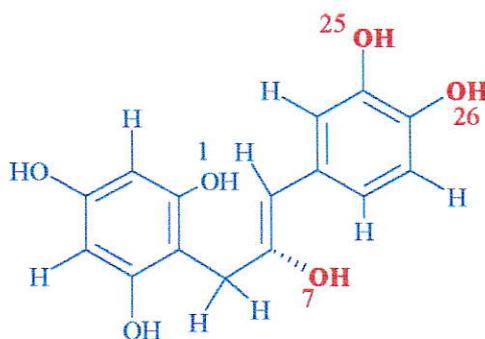


Figura 2.2.2. Estructura correspondiente a la Catequina modificada por reordenamiento de H, de acuerdo la estructura VII propuesta en el Esquema 2.2.1.

Con el objeto de probar esta hipótesis, se realizó el análisis local en la estructura VII del Esquema 2.2.1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.2.5. Con referencia a la molécula de Catequina. Se observa que el reordenamiento intramolecular de H produce la activación del sitio O7, en que la blandura local en ese sitio se incrementa desde 0.0013 en Catequina, a 0.1800 en la Catequina modificada VII del Esquema 2.2.1. Notar que el reordenamiento solo produce una respuesta muy localizada en las vecindades del sitio O7, ya que los otros potenciales sitios de deshidrogenación permanecen con una baja probabilidad de intervenir en el proceso no concertado de deshidrogenación en Catequina.

Molécula	Sitio (k)	f_k^\bullet	$s_k^\bullet = f_k^\bullet S$
Catequina modificada	O7	0.0273	0.1800
	O25	0.0195	0.1287
	O26	0.0388	0.2559
	O6	0.0062	0.0414
	O13	0.0058	0.0382
	O14	0.0064	0.0421

Tabla 2.2.5. Funciones de Fukui regionales y blanduras locales para los estados fundamentales de la estructura propuesta en la Figura 2.2.2 ^{a)}.

^{a)} El valor de blandura global S es 6.59 u.a. Valores obtenidos a partir de cálculos AM1. Para identificar la numeración de cada centro, ver Figura 2.2.1.

La información que proporciona la Tabla 2.2.5, permite proponer la reactividad de 3 Hidrógenos de acuerdo con el dato experimental que sugiere el índice $ERR = 3.1$. A Partir del mecanismo propuesto en el Esquema 2.2.1, la estructura (VII) es un producto de oxidación que proporciona un sitio adicional de deshidrogenación, *activado* por el reordenamiento intramolecular del H (H33 de la estructura original de Catequina, ver estructura VI de la Figura 2.2.1). Notar sin embargo que el índice ERR se relaciona con los índices de reactividad locales con referencia a los productos de control cinético. El cuadro térmico desfavorable para la salida de tres hidrógenos en Catequina no contradice la existencia del intermediario VII propuesto en el Esquema 2.2.1, ni tampoco la *activación* del sitio O7 por reordenamiento interno de un átomo de Hidrógeno.

Quercetina y Rutina son dos sistemas estructuralmente relacionados, en el sentido que la segunda es el derivado metilado (en la posición O8) de la primera. Este hecho da la oportunidad de analizar activación y desactivación de sitios inducidos por sustitución química. El análisis local en Quercetina es consistente con dos hidrógenos equivalentemente activos en las posiciones O8 y O27 mas uno (aquel unido al sitio O26) que presenta una significativa pero menor blandura local radicalaria. El análisis termodinámico muestra consistentemente que el producto de las dos primeras deshidrogenaciones conducen a intermediarios estables, con energías libres de formación negativas (-79.5 y -55.4 Kcal/mol respectivamente). El intermediario que se formaría en la tercera deshidrogenación homolítica muestra un valor marginalmente

negativo, determinado principalmente por efectos entrópicos. El análisis local es sin embargo consistente con el valor $ERR= 2.4$ para este sistema, que predice de acuerdo al criterio establecido en la primera parte de este capítulo, dos átomos de hidrógeno radicales activos. El reemplazo del hidrógeno unido al centro O8 que es activo en Quercetina produce la activación de los sitios O26 y O27, dejando dos átomos de hidrógeno radicales activos para el proceso de deshidrogenación en Rutina. Este resultado es también coherentemente con el valor $ERR= 1.5$ para Rutina. Notar además que el análisis térmico en Rutina concuerda también con la estabilidad de los intermediarios de las dos primeras deshidrogenaciones. Un aspecto adicional en la comparación de Quercetina y Rutina es que la similaridad en sus reactividades globales esta relacionada con sus respectivas blanduras globales que resultan ser las mas próximas en la serie, mientras que la similaridad en sus reactividades locales responde a un efecto de activación de sitios promovidas por sustitución química en el sitio O8, que es activo en Quercetina: el bloqueo del sitio O8 por el grupo metilo, activa claramente los sitios O26 y O27, dejando globalmente dos hidrógenos activos para la deshidrogenación homolítica.

2.2.7 DISCUSIÓN GENERAL

Se ha presentado un modelo teórico para interpretar dentro de una aproximación local y termodinámica los patrones de deshidrogenación en los sistemas Acido Gálico, Acido Caféico, Catequina, Quercetina y Rutina como modelos de deshidrogenación en polifenoles. El análisis local se relaciona dentro de un modelo perturbativo, con el progreso de las reacciones químicas en etapas tempranas con respecto a un camino de reacción no especificado, principalmente con los productos de control cinético de una reacción. Estos índices contienen esta información pues corresponden a derivadas de la energía (dureza química y blandura global) con respecto al cambio en el número de electrones; o derivadas de la densidad electrónica con respecto al número de electrones (función de Fukui). La blandura local, a pesar de tener una relación simple con la función de Fukui, a través de una transformación lineal que involucra a la blandura global S , es una derivada implícita de la densidad electrónica, esta vez con respecto al potencial químico electrónico μ que describe los cambios de energía electrónica con respecto al cambio en el número de electrones N . De este modo, los índices locales y globales describen formalmente la pendiente de alguna función potencial (energía total, energías libres o entalpías) con respecto al progreso de la reacción y contienen por lo tanto información acerca de la posición relativa de especies intermediarias tipo complejos activados o estados de transición. Estos índices evitan precisamente la caracterización completa de estas estructuras, sacrificando la descripción cuantitativa de

parámetros de activación, pero contienen de un modo implícito esta importante información. Por lo tanto, la reactividad química involucrada en estos índices se relaciona de algún modo indirecto con los *productos cinéticos* de las reacciones. Es precisamente este rasgo conceptual de los índices de reactividad el que permitió sugerir un cierto orden en los procesos sucesivos de deshidrogenación para proponer una jerarquía e identificar los centros más lábiles dentro de una estructura en estos procesos. Este resultado es particularmente interesante dado que en la primera sección de este Capítulo el consumo del radical derivado del ABTS inducido por los polifenoles, quedó descrito para todos los casos como procesos bi-fásicos. Este comportamiento se explica bastante bien con el mecanismo de deshidrogenaciones no concertada, es decir que en la fase rápida reaccionarían aquellos hidrógenos más lábiles y en la lenta los menos reactivos, quedando así mas debilitada la hipótesis que asocia a que productos de oxidación secundarios serían los responsables del consumo en al fase lenta. Con la sola excepción de Acido Caféico, los índices locales se relacionan cualitativamente con el índice ERR que describe principalmente aquellos productos de control cinético (es decir aquellos que se forman en las etapas tempranas de las reacciones de deshidrogenación). En alguno de los casos (Acido Caféico y Acido Gálico) el análisis termodinámico desarrollado en torno a las energías libres, entalpías y entropías de formación de los intermediarios resultan consistentes con el índice ERT. Los aspectos puramente termodinámicos (control termodinámico) suelen complementar generalmente la información cinética, a pesar que es conocido que ambos aspectos contienen información diferente sobre un proceso químico en particular. Sin embargo, el modelo propuesto muestra una gran coherencia en este sentido. Aquellos centros que se predicen

escasamente activos para la deshidrogenación homolítica conducen en general a productos que son termodinámicamente inestables. En la mayoría de los casos esta inestabilidad proviene de factores térmicos relacionados con entalpías de formación. Sin embargo, en Acido Caféico, se observa que la entropía de formación en la segunda deshidrogenación facilita la estabilización del producto MH, para una contribución térmica marginal de la entalpía de formación. En general, en los cinco sistemas estudiados, hay una buena coherencia entre la actividad predicha a partir del análisis teórico, y los índices empíricos definidos en la primera parte de este Capítulo, principalmente el índice ERR para los procesos de deshidrogenación secuencial no concertada de estos sistemas. Mientras en Catequina la coincidencia entre el análisis de Fukui y blanduras locales y el índice ERR se explica mediante una activación de sitios inducida por reordenamiento, en Rutina la activación del tercer centro activo para homólisis se explica por una activación de sitios promovida por el bloqueo de un sitio activo en Quercetina

2.3 CONCLUSIONES

Se ha caracterizado el comportamiento cinético de polifenoles y de mezclas complejas de ellos basado en el método de decoloración del radical derivado del ABTS. Este ha permitido obtener medidas de capacidad antioxidante evaluadas en la etapa rápida y lenta de la reacción a través de los índices ERR y ERT. Estos índices pueden ser relacionados con el número de grupos fenólicos totales con capacidad antioxidante (ERT), siendo el ERR el índice que ha permitido distinguir el número de hidroxilos más reactivos dentro de cada molécula.

Se ha propuesto un modelo teórico simple, basado en índices globales y locales de reactividad complementado con un análisis termodinámico acerca de las estabilidades relativas de los intermediarios posibles en la deshidrogenación secuencial de estos sistemas. Los índices locales se relacionan convenientemente con el índice empírico ERR que caracteriza principalmente los productos de control cinético de las reacciones de deshidrogenación. A pesar que no es posible establecer correlaciones cuantitativas entre las variables teóricas locales y el índice ERR, ambas se complementan consistentemente con el análisis termodinámico para describir un patrón de reactividad bien caracterizado experimentalmente.

2.4 REFERENCIAS

1. N. Saint-Cricq, C. Provost and N. Vivas, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 425 (1999)
2. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller and G. Paganga, *Free Rad. Biol. Med.*, **20**, 933 (1996).
3. A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini and A. Ferro-Luzzi, *Free Rad. Biol. Med.*, **18**, 29 (1995)
4. E.A. Lissi, M. Salin-Hanna, C. Pascula, M.D. del Castillo, *Free Rad. Biol. Med.* **18**, 153 (1995)
5. N. J. Miller and C. A. Rice-Evans, *Method Enzymol.*, **234**, 279 (1994).
6. N. J. Miller and C. A. Rice-Evans, *Redox. Reports*, **2**, 161 (1996)
7. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. A. Rice-Evans, *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231 (1999)
8. C. Romay, C. Pascual and E. A. Lissi, *Braz. J. Med. And Biol. Res.* **29**, 175 (1996)
9. A. Arora, M.G. Nair and G.M. Strsburg, *Free Rad. Biol. Med.* **24**, 1355 (1998)
10. D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold and S. Locke, *FEBS Lett.* **187**, 33 (1985)
11. G. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler, *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 303 (1993)
12. R.L. Atanasiu, D. Stea, M.A. Mateescu, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, V. Maupoil, L. Rochette, *Mol. Cell. Biochem.* **189**, 127 (1998)
13. A. M. Campos and E.A. Lissi, *Int. J. Chem. Kinet.* **29**, 219 (1997)

14. M.J.S. Dewar, E.G. Zoebish and E.F. Healy, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902 (1985).
15. P. Pérez, R. Contreras, *Chem. Phys. Lett.* **293**, 239 (1998).
16. R. Contreras, P. Fuentealba, M. Galván, P. Pérez., *Chem. Phys. Lett.*, **304**, 405, (1999)
17. F. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Third Edition*, Plenum Press, New York, London, Part A, 1990.
18. M. R. Frierson III, R. Klopman and R. Contreras, in *Frontier Molecular Orbital Theory and Chemical Reactivity*, M.J.S Dewar and R. Hudson (Eds.), University Press, London, New York, (1981), p. 45.
19. Ira N. Levine, *Fisicoquímica*, IV Ed., McGraw-Hill, London, San Francisco, Tokio, (1999), Vol. I p.144.
20. Y. Simón-Manso, P. Fuentealba, *J. Phys. Chem. A.* **102** , 2029, (1998)
21. P.K. Chattaraj, S. Sengupta, *J. Phys. Chem.* **100**, 16126, (1996).
22. Y. Li, N.S. Evans, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7756 (1995)
23. P. Pérez, Y. Simón-Manso, A. Aizman, P. Fuentealba, R. Contreras, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4756, (2000).
24. Pearson, R.G., *Hard and Soft Acids and Bases*, Dowden, Hutchinson and Ross: Stroudsburg, PA, (1973).
25. S.H. Pine, J.B. Hendrickson, D.J. Cream and G.S. Hammond, *Química Orgánica*, Ed. McGraw-Hill Segunda Ed (1988) .Capítulo Fotoquímica p. 1022.

CAPITULO III

CINÉTICA Y MECANISMO DE LA REACCIÓN DE UN RADICAL NITRÓXIDO (TEMPOL) CON UN ANTIOXIDANTE FENÓLICO (TROLOX)

3.1 INTRODUCCION

Los radicales nitróxidos constituyen una de las familias de radicales libres más extensamente empleados en química y en medios biológicos. Debido a sus características han sido utilizados como pruebas de espín [1], como un producto altamente estable en experimentos de atrapamiento de espín [2] y en polimerizaciones como iniciadores o retardadores de este proceso [3]. El conocimiento y comprensión de la reactividad de estos radicales se hace fundamental para permitir una evaluación cuantitativa de la acción de radicales libres en sistemas biológicos [4,5]. De la misma manera, la adición de sustancias capaces de reaccionar con radicales nitróxidos podría cambiar dramáticamente las cinéticas, por ejemplo de polimerizaciones y las propiedades del polímero producido. A pesar de todo este amplio interés, existen pocos

estudios cinéticos dedicados a la reactividad de radicales nitróxidos con substratos no radicalarios y el efecto de trazas de metales sobre estas reacciones. Este último aspecto podría ser relevante cuando los radicales nitróxidos son producidos en sistemas biológicos.

Se han obtenido datos cinéticos en la reacción de radicales nitróxidos con ácido ascórbico [4,6,7] y con hidroxilaminas [8,9]. Además, hay reportes de reacciones rápidas de radicales nitróxidos con ubiquinol-9 [5]. Un estudio realizado por K. Kikugawa, demostraron que las señales de EPR del aducto DMPO-OH (preparado en presencia de Fe^{2+} en una reacción tipo Fenton) y TEMPO decrecían en presencia de antioxidantes fenólicos como Trolox y con antioxidantes tiólicos como Cisteína, Glutatión y 2-mercaptoetanol descritas como reacciones bastante rápidas [10]. También, hay reportes parciales que muestran la capacidad de ciertos nitróxidos para participar en procesos redox con iones metálicos [11, 12].

La estabilidad de los radicales nitróxidos se debe tanto a los desfavorables procesos redox como a la debilidad del enlace O-H de la hidroxilamina [13]. Entonces, los substratos que reaccionen con los radicales nitróxidos serán fuertes reductores y/o compuestos con un hidrógeno lábil en su estructura. Entre esos compuestos se pueden incluir los fenoles y los tioles. Al revisar la literatura, las reacciones de esos compuestos con radicales nitróxidos resulta inconsistente. Lissi *et al.* han establecido que, en solventes orgánicos los fenoles no reaccionarían con los radicales nitróxidos y que las cinéticas de la reacción con tioles resulta compleja, con claras evidencias de catálisis mediada por metales [9, 14]. Debido a que la reactividad observada podría deberse a la

catálisis por trazas de metales (i.e., iones Fe o Cu) [14] en esta tesis se ha realizado un estudio de la cinética y mecanismo de reacción del nitróxido soluble en agua 4-Hidroxi-2,2,6,6,-tetra-metilpiperidin-1-oxilo (TEMPOL) con un antioxidante conocido como el análogo hidrosoluble de la vitamina E (el ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), Trolox.

3.2 MATERIALES Y METODO

Ambos reactivos, TEMPOL y Trolox fueron adquiridos y utilizados tal cual fueron recibidos de laboratorios Sigma. La hidroxilamina derivada del Tempol, fue preparada siguiendo un protocolo estándar, empleando la mezcla reductora Cloruro de Amonio/Zinc. Para ello se pesaron 0.0172 g del Nitróxido, los que fueron disueltos en 10 ml de agua acidulada con 0.0780 g de NH_4Cl . La reacción se mantiene en agitación por 30 minutos una vez que se agrega Zn en polvo (0.18 g) a la mezcla [15].

La solución stock de TEMPOL fue preparada en una solución amortiguada a pH 7.0 de sales fosfatadas de Potasio (KH_2PO_4 y K_2HPO_4). Todas las soluciones fueron preparadas en agua pre-tratada, con Chellex-100 con el objeto de minimizar la concentración de trazas de metales. Para estos efectos, las soluciones fueron agitadas durante toda la noche en presencia de 1g/L de la resina. Además, a ciertas soluciones se les agregó ácido di-etilentriaminopentaacético (DTPA) 0.1 mM, para quelar posibles trazas remanentes de metales.

La concentración del nitróxido fue evaluada espectrofotométricamente a los 240 nm utilizando un coeficiente de extinción $\varepsilon = 1440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [16].

Una alícuota de la solución *stock* de TEMPOL fue mezclada con la solución tampón para lograr la concentración de trabajo en el rango micro-molar ($\sim 10 \mu\text{M}$). La concentración de Nitróxido inicial fue evaluada midiendo el tamaño de la señal en un

espectrómetro de Resonancia de Espín Electrónico (EPR) Bruker ER 200D-SRC a un campo magnético fijo, centrado a 3426 Gauss. Las mediciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y la intensidad de la señal medida en el EPR fue directamente relacionada a la concentración de espín. Para conocer las variaciones de la concentración de TEMPOL en el transcurso de la reacción, se hizo un registro en el tiempo de la intensidad de la señal ubicada a los 3426 Gauss. Para expresar la intensidad de ésta señal en unidades de concentración se hizo una relación lineal entre el valor de la intensidad registrada en el espectro inicial, cuya concentración es conocida, (obtenido previo a la adición de Trolox) y las intensidades registradas en el tiempo. Así mismo, la concentración asociada al espectro final fue extrapolada a partir del área calculada para el espectro inicial.

A fin de conocer los efectos de la concentración de Oxígeno sobre la reacción, se realizaron medidas en presencia y en ausencia de éste. Para esto se burbujeó de N_2 en las soluciones previo al proceso de mezclado en la celda de reacción.

Ferricianuro de Potasio ($\text{KFe}(\text{CN})_6$) (MERCK) fue utilizado para oxidar la Hidroxilamina formada a fin de probar la reversibilidad del proceso. Para esto se agregaron concentraciones crecientes del oxidante y se evaluó la concentración de TEMPOL recuperada.

3.3 RESULTADOS

La adición de Trolox (10 mM) reduce rápidamente el tamaño de la señal de EPR asociada al Tempol (10 μ M) sin que se observen cambios significativos en la forma del espectro (Figura 3.1). Perfiles típicos para el consumo de Tempol por Trolox, en ausencia y en presencia de DTPA, se muestran en la Figura 3.2. En esta figura se puede observar que el agente quelante reduce la velocidad de la reacción en c.a. 25 %. A partir de este resultado las medidas cinéticas fueron llevadas a cabo en agua pretratada con Chellex-100 y en la presencia de 0.1 mM de DTPA. El consumo de Tempol es independiente de la concentración de oxígeno (Figura 3.3).

Los datos cinéticos obtenidos en exceso de Trolox fueron ajustados a un decaimiento mono-exponencial (Figura 3.3). Con el objeto de obtener parámetros cinéticos para la reacción entre TEMPOL y Trolox, fueron calculadas las pendientes iniciales a partir de los gráficos concentración vs. tiempo, calculando la primera derivada del ajuste mono-exponencial realizado (Ecuación 3.1) y extrapolado a tiempo cero (Ecuación 3.2).

$$[\text{TEMPOL}] = [\text{TEMPOL}]_0 + Ae^{-(t-t_0)/k} \quad (3.1)$$

$$\frac{d[\text{TEMPOL}]}{dt} = R_0 = \frac{A}{k} \quad (3.2)$$

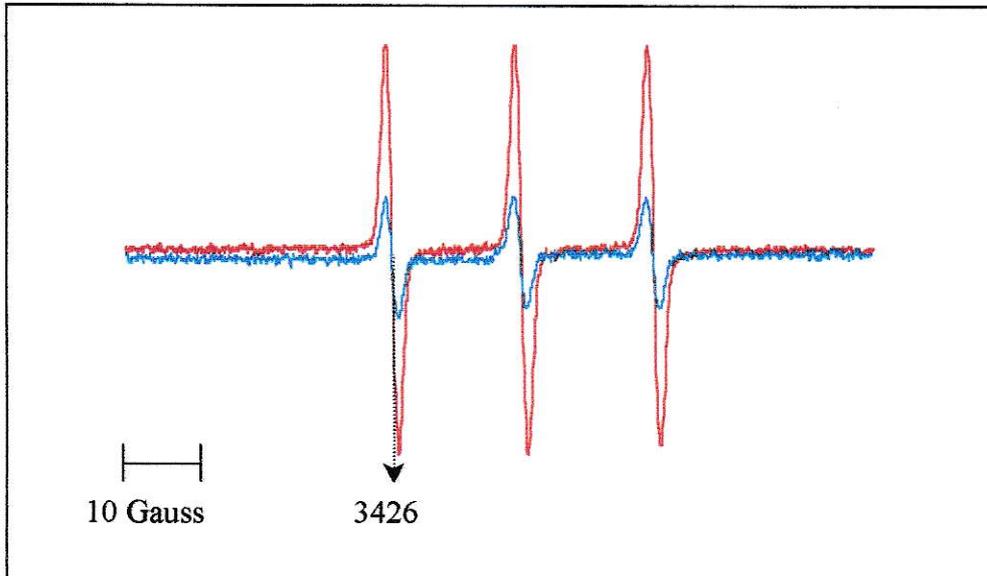


Figura 3.1. Espectro de EPR correspondiente a 10 μM de TEMPOL (—) (100%). Intensidad de la señal luego de 30 minutos de agregados 10 mM de Trolox (—) (29% de la señal inicial)

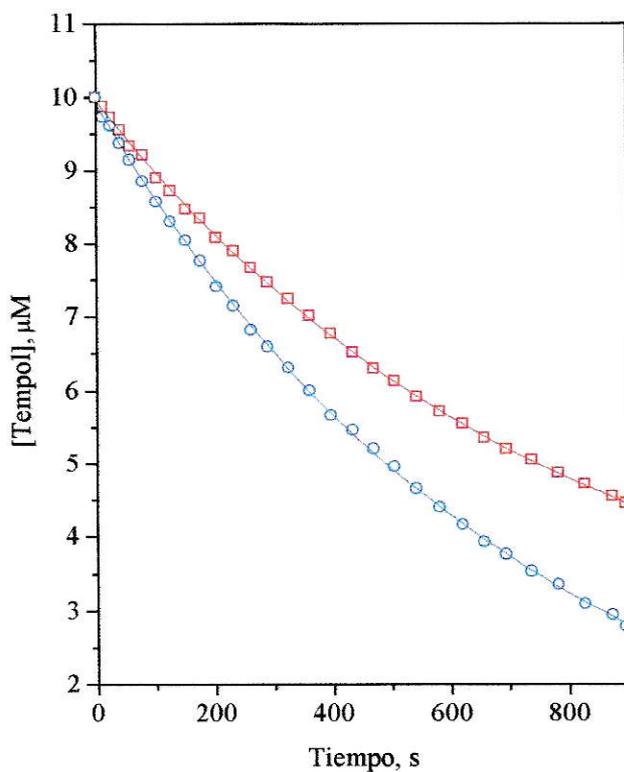


Figura 3.2. Efecto de la adición de DTPA (0.1 mM) en la velocidad de consumo de TEMPOL (10 μM) inducido por la adición de 10 mM de Trolox a pH 7.0. Experimentos realizados en buffer que no ha sido pre-tratado con Chellex-100. (○) Experimento control sin DTPA. (◻) Experimento realizado en presencia de DTPA.

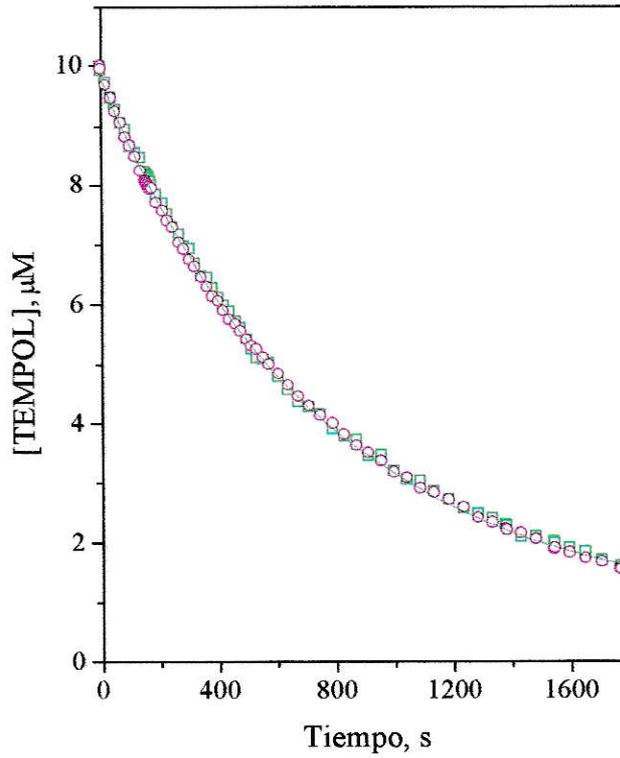


Figura 3.3. Efecto de la remoción de oxígeno en la velocidad de consumo de TEMPOL (○) Experimento en presencia de aire. (◻) Experimento en solución purgada con nitrógeno. El ajuste corresponde a un decaimiento mono-exponencial.

3.4 DISCUSION

A pesar que los datos pudieron ser muy bien ajustados al decaimiento mono-exponencial, el ajuste arroja una pequeña señal residual (ca. 10%). De hecho, los datos mostrados en la Figura 3.2 pueden ser ajustados a la siguiente ecuación:

$$[\text{Tempol}](\mu\text{M}) = 0.91 + 9.0 e^{(0.0014 t)} \quad (3.3)$$

con t en segundos. El valor de la constante (0.91) indicaría que la reacción muestra algún grado de reversibilidad, lo que puede ser atribuido a la oxidación espontánea de hidroxilamina, obtenida como producto de la reducción del nitróxido. Esto además es soportado por el resultado obtenido agregando 20 μM de hidroxilamina al inicio de la reacción, lo que reduce la velocidad de la reacción en un 50 %, aproximadamente (Figura 3.4). De manera similar, la adición de una cantidad adicional de Tempol luego del consumo casi total de los primeros 10 mM, produce una cinética que es levemente más lenta, dejando un residuo mas alto como se muestra en la figura 3.5. De hecho, mientras el consumo inicial ocurre con una constante de velocidad de $1.25 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, dejando un residuo de 0.74 μM de Tempol (evaluado en una extrapolación de la mono-exponencial a tiempo infinito) el decaimiento después de un segunda adición de Tempol

ocurre con una constante de velocidad de $0.96 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, y deja $1.7 \mu\text{M}$ de Tempol cuando se efectúa la extrapolación a tiempo infinito.

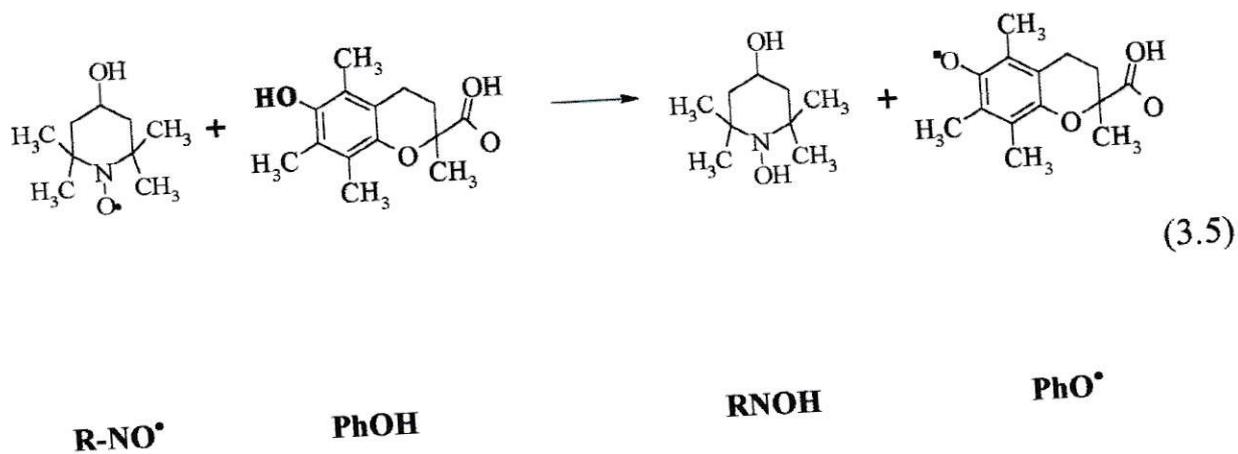
Las pendientes iniciales mostraron dependencia con ambas concentraciones, tanto de Trolox como de TEMPOL. La dependencia de la velocidad inicial a distintas concentraciones de Trolox a una concentración fija de TEMPOL $10 \mu\text{M}$ se muestra en la Figura 3.5, mientras que la dependencia de la velocidad inicial con TEMPOL a una concentración fija de Trolox (10 mM), se muestra en la Figura 3.6. Las pendientes obtenidas fueron $0.90 \pm 1.2 \times 10^{-2}$ y $0.95 \pm 4.4 \times 10^{-3}$ para los ordenes en Trolox y TEMPOL, respectivamente. Bajo todas las condiciones experimentales empleadas, la velocidad inicial a pH 7.0 puede ser expresado por:

$$-\frac{d[\text{Nitróxido}]}{dt} = [\text{Trolox}][\text{TEMPOL}] \quad (3.4)$$

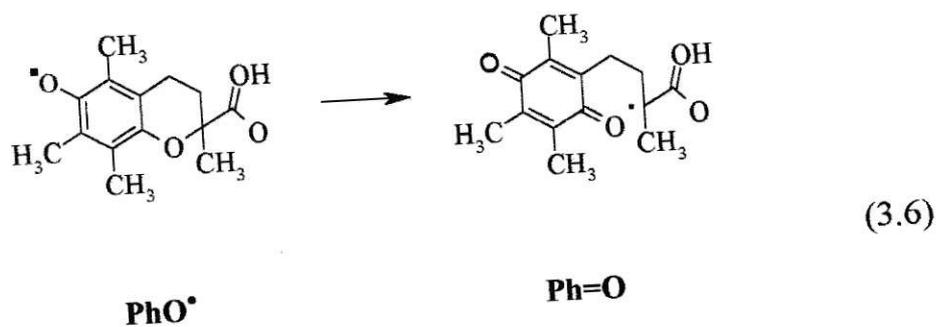
con

$$k = 0.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Esta ecuación de velocidad, así como la falta de efecto de Oxígeno, es compatible con una reacción que toma lugar en un paso bi-molecular simple:



seguido de la ruptura del radical fenoxilo:



La formación de la hidroxilamina (4-Hidroxi-2,2,6,6,-tetra-metilpiperidin-1-hidroxilo, RNOH) propuesta en este paso, fue confirmada induciendo la oxidación de éste producto con Ferricianuro de Potasio (Figura 3.7). La adición de este oxidante al final de la reacción regenera c.a. 70 % de la señal inicial del nitróxido.

La reacción bimolecular entre el nitróxido y el fenol puede corresponder a una abstracción de hidrógeno (tal como se representa en la ecuación 3.5) o puede obedecer a una transferencia electrónica como:



seguida por la protonación del anión nitróxido a la correspondiente hidroxilamina. Si la reacción (3.7) fuera la reacción dominante, debiera esperarse que a pHs considerablemente más bajos que el pK_a del Trolox (11.8), la velocidad de la reacción debería ser inversamente proporcional a la concentración de protones. El efecto de pH sobre la velocidad inicial se muestra en la Figura 3.8. Estos datos muestran una dependencia muy pequeña de la velocidad inicial con el pH, siendo el orden en protones obtenido a partir de la pendiente del gráfico de la Figura 3.8 de aproximadamente -0.05 . Esto está en contradicción con el orden esperado (-1.0) para el proceso si queda descrito por la ecuación 3.7. Esto implica que la reacción principal corresponde a una abstracción de Hidrógeno, tal como queda representada en la ecuación 3.5.

Otra posibilidad es una reacción entre una pequeña cantidad del Nitróxido protonado y el fenolato:



La velocidad de este proceso también podría ser independiente del pH. La constante de velocidad específica del proceso (3.8) está relacionada con la constante de velocidad (k) de velocidad de segundo orden determinada experimentalmente por:

$$\log k_7 = \log k + |\Delta pK_{\text{Trolox}}| + |\Delta pK_{\text{TEMPOL}}| \quad (3.9)$$

donde $|\Delta pK|$ corresponde al valor absoluto de la diferencia entre el pK del compuesto considerado y el pH de trabajo. Tomando 11.8 y 0 como los valores de pKa de Trolox y el de la Hidroxilamina [16], la relación (3.8) lleva a:

$$\log k_7 = \log k + 11.8 \quad (3.10)$$

y así

$$\log k_7 \approx 10.8 (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}) \quad (3.11)$$

Esta estimación no descarta completamente la factibilidad de la reacción (3.8). Sin embargo, este proceso puede explicar los datos obtenidos sólo si la reacción (3.8) está en el límite del control difusional.

La discusión anterior indica que, en ausencia de metales, para esto los solventes son pre-tratados con Chellex-100 y en presencia de DTPA 0.1 mM, la velocidad inicial del proceso puede ser explicada en términos de una reacción bimolecular lo más probablemente involucra al fenol protonado como sustrato.

También se determinó que la presencia de metales puede catalizar este proceso, como queda evidenciado por la disminución en la velocidad observada en la presencia de DTPA. Además, la adición de Fe (II) a través de 20 μM de Ferricianuro de Potasio, produce un notable aumento en la velocidad de consumo de TEMPOL (Figura 3.7).

La participación de metales también fue determinada en reacciones de reducción de Nitróxidos promovida por tioles, en un estudio realizado por Rosen *et al.* [18]. Este estudio propone la participación del anión superóxido en el mecanismo de formación de la hidroxilamina derivada. En este caso la producción de superóxido es mediada por una reacción tipo Fenton, la cual queda inhibida en presencia de agentes quelantes y/o de la enzima superóxido dismutasa. Esta explicación es válida para experimentos realizados previamente en sistemas acuosos en donde no se observó reducción de la señal de Tempol por tioles, como Cisteína o Glutatión.

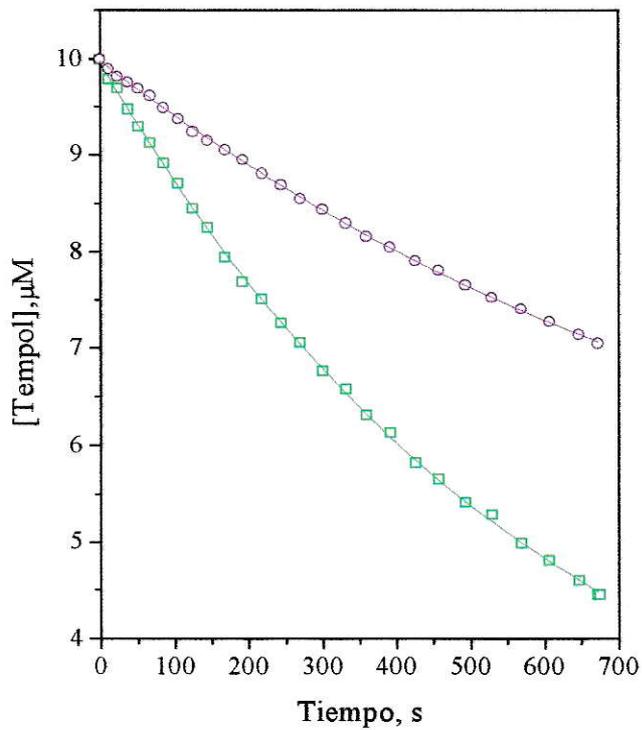


Figura 3.4. Efecto de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-1-piperinilhidroxilamina ($20 \mu\text{M}$) en la reacción de TEMPOL (10 mM) con Trolox (10 mM). (○) Control, sin hidroxilamina; (□) Experimento en presencia de hidroxilamina.

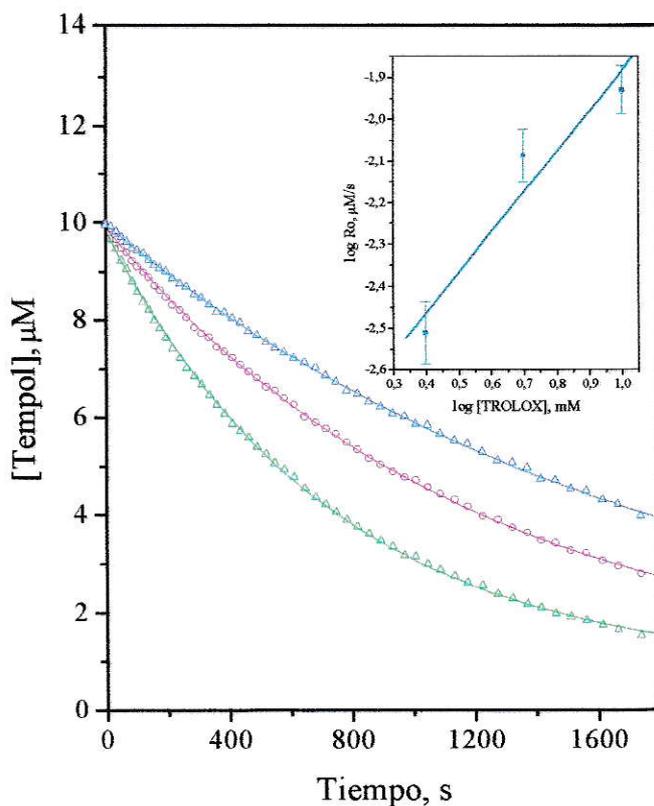


Figura 3.5. Dependencia de la constante de velocidad pseudo-unimolecular como una función de la concentración de Trolox, medida a concentración fija de TEMPOL (10 μM), (Δ) 2.5 mM Trolox; (\circ) 5 mM Trolox; (\square) 10 mM Trolox. En el inserto se muestra la dependencia del log de la constante de velocidad como una función del log de la concentración de Trolox.

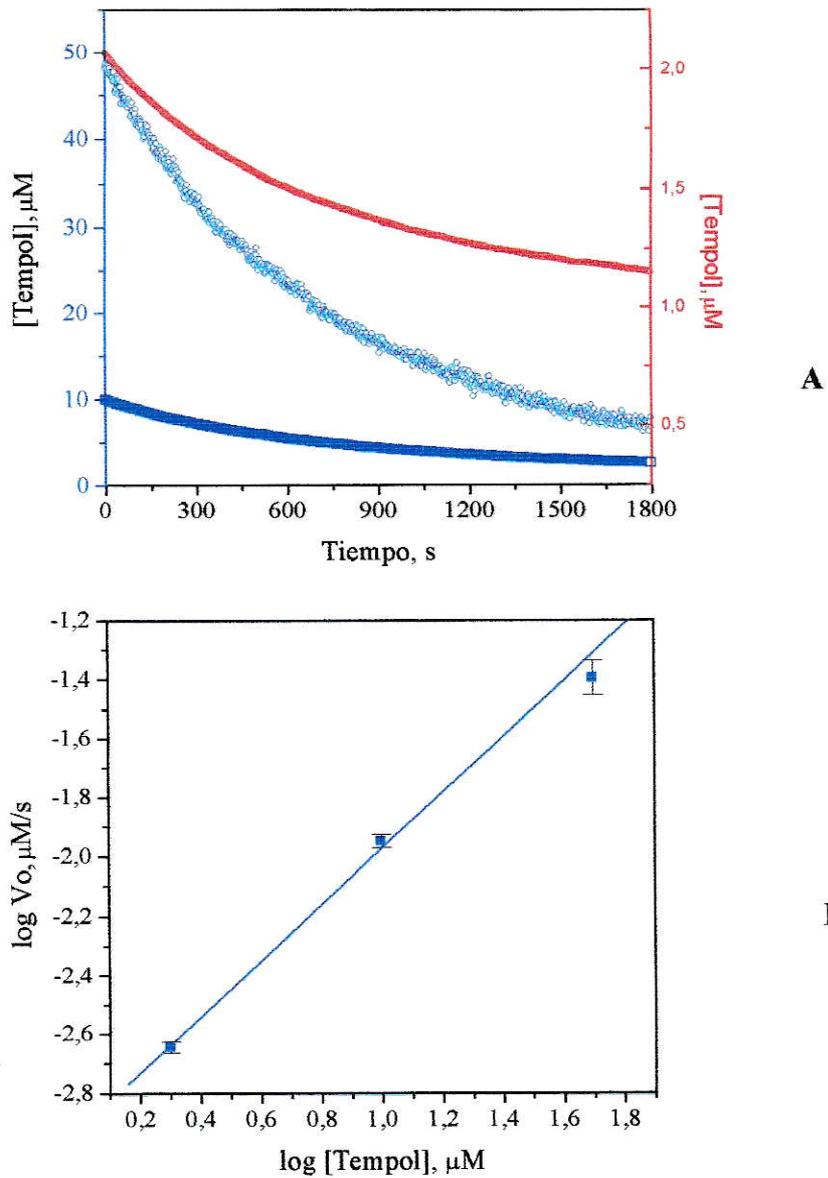


Figura 3.6. A. Consumo de Tempol en el tiempo medidos a concentración fija de Trolox (10 mM): (○) 2.0 μM Tempol; (○) 10 μM Tempol; (□) 10 μM Tempol. B. dependencia del log de la constante de velocidad como una función del log de la concentración de Tempol.

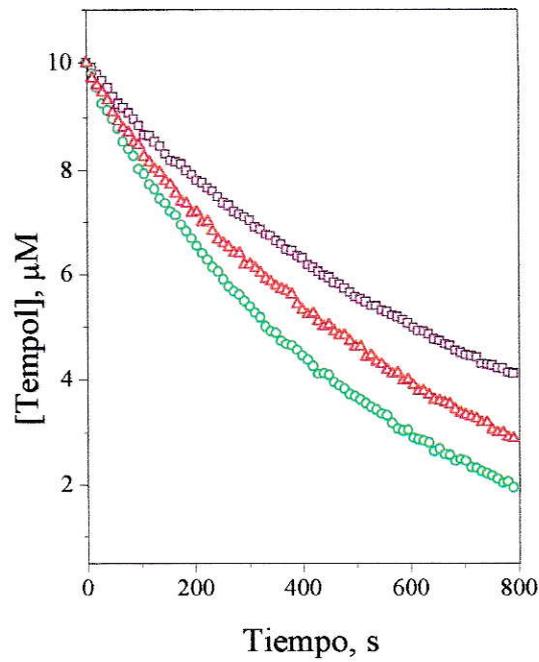


Figura 3.7. Efecto de metales en la velocidad de reacción entre TEMPOL y Trolox (□) reacción libre de metales; (Δ) reacción en presencia de 20 μM de Fe^{3+} ; (○) reacción en presencia de Fe^{2+} /EDTA 1:2.

3.5 CONCLUSIONES

Los resultados muestran que un antioxidante fenólico como es Trolox, es capaz de reducir la señal de Tempol en una reacción bimolecular caracterizada por un mecanismo que involucra una transferencia de Hidrógeno. La presencia de metales en el medio de reacción posiblemente catalizan la reacción, aumentando la velocidad de decrecimiento de la señal de EPR asociada al nitróxido compuesto. Este resultado es relevante al momento de realizar ensayos que utilizan la técnica de atrapamiento de espín para la detección de especies radicalarias inestables en sistemas biológicos.

3.6 REFERENCIAS

1. Berliner L.J., Ed, In : Spin labeling. Theory and Applications. New York, Academic Press, 1975.
2. E. Finkelstein, G.M. Rosen and E.J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **200**, 1 (1980)
3. Hammouch, S.O. and Catala, J-M. "Living radical" polymerization of styrene in the presence of a nitroxide compound. *Macromol. Rapid Commun.* **17** (1996) 683-691.
4. Belkin, S., Mehlhorn, R.; Hideg, K.; Hankovsky, O.; Packer, L. Reduction and destruction rates of nitroxide spin probes. *Arch. Biochem. Biophys.* **256** (1987) 232-243.
5. Fuchs, J., Groth, N., Herrling T., and Zimmer G. Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical TEMPO redox reactions in human skin. *Free Rad. Biol. Med.* **22** (1997) 967-976.
6. Couet, W.R., Brasch, R.C., Sosnovsky, G., Tozer, T.N. Factors affecting nitroxide reduction in ascorbate solution and tissue homogenates. *Magn. Reson. Imag.* **3** (1985) 83-88.
7. Morris, S., Sosnovsky, G., Hui, B., Huber, C.O., Rao, N.U.M. and Swartz, H.M. Chemical and electrochemical reduction rates of cyclic nitroxides. *J.Pharm. Sci.*, **80** (1991) 149-152.
8. Schwartz, M.A., Parce, J.M., Mc Connell, H.M. Hydrogen atom exchange between nitroxides and hydroxylamines. *J.Am.Chem.Soc.* **101** (1979) 3592-3597.

9. Lissi, E.A., Rubio, M.A., Araya, D. and Zanocco, G. Reaction of di-tert-butyl nitroxide radicals. *Int. J. Chem. Kinetics* **12** (1980) 871-881.
10. Hiramoto K., Ojima N. and Kikugawa, K. Conversion of nitroxide radicals by penolic and thiol antioxidants. *Free Rad Res* **27** (1997) 45-53.
11. Cáceres, T., Urzúa, C. and Lissi, E.A. Decomposition of di-ter-butyl nitroxide in aqueous solutions. *Int. J. Chem. Kinetics* **17** (1985) 109-116.
12. Glebska, J. and Gwozdziński K. Effects of redox-active metals on antioxidant properties of nitroxides. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo* **34** suple. **1** (1998) 103.
13. Cáceres, T., Lissi, E.A. and Sanhueza, E. Autoxidation of diethyl hydroxylamine. *Int. J. Chem. Kinetics* **10** (1978) 1167-1182.
14. Finkelstein E., Rosen G.M. and Rauckman E.J. Superoxide-dependent reduction of nitroxides by thiols. *Biochim Biophys Acta* **802** (1984) 90-98.
15. A. I. Vogel, "Practical Organic Chemistry", Addison-Wesley Pub Co. 5th edition (1989).
16. Hoffman B.M. and Eames, T.B. Protonated nitroxide free radical. *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 2169-2170.

APENDICE I

I.1. Relación entre los niveles moleculares microscópicos y variables termodinámicas macroscópicas.

Los niveles electrónicos de energía en los sistemas moleculares describen uno de los aspectos más relevantes de la estructura electrónica de un sistema aislado con N electrones y M núcleos. La obtención de estos niveles de energía se realiza aproximando el problema de N cuerpos mediante la teoría Hartree Fock, que deja al problema transformado en N problemas a una sola partícula, en el campo de un potencial efectivo conocido como potencial de Hartree-Fock. Las ecuaciones de Hartree-Fock se resuelven en general para sistemas aislados, de modo que el acoplamiento con campos externos o con un baño térmico debe ser introducido posteriormente, utilizando los niveles energéticos para construir funciones de distribución estadísticas. Uno de los modos naturales de obtener información en la forma de variables microscópicas, específicamente funciones termodinámicas, lo provee la termodinámica estadística. En su formulación más general, la mecánica estadística relaciona variables microscópicas con sus contrapartes microscópicas, a partir de las funciones de partición, que contienen la información relevante acerca de las propiedades del sistema microscópico. El más simple de los colectivos o *ensambles*, es el ensamble canónico, para el cual la función de partición adopta la forma siguiente:

$$(A1) \quad Z(N, V, T) = \sum_j \exp(-E_j(N, V) / kT);$$

en que N, V, T es el número de moléculas N en un volumen V a una temperatura T . e_j representa los niveles de energía del sistema microscópico (igual a las energías monoeléctricas de Hartree-Fock de una sola molécula) y la suma se realiza sobre todos los estados ocupados del sistema molecular con un número de ocupación $n(i) = 0, 1, 2$, si se tienen en cuenta las restricciones de espín. La función de partición sirve como puente natural entre los niveles de energía mecano-cuánticos en el límite de temperatura cero, y las propiedades termodinámicas del sistema microscópico que le corresponde en el ensamble a temperaturas finitas [1]. La función de partición es además una herramienta útil para obtener valores medios de cualquier propiedad mecánica. Por ejemplo, la energía total (interna) promedio en este ensamble se obtiene como:

$$(A2) \quad \bar{E} = \bar{E}(N, V, \beta) = \frac{\sum_j E_j(N, V) \exp(-\beta E_j(N, V))}{\sum_j \exp(-\beta E_j(N, V))};$$

en que $\beta = 1/kT$ donde k es la constante de Boltzmann. Usando la expresión (1) es posible rescribir la ecuación (2) como sigue:

$$(A3) \quad E = kT^2 \left(\frac{\partial \ln QZ}{\partial T} \right)_{N,V}.$$

Del mismo modo, la energía libre de Helmholtz se define como:

$$(A4) \quad A = -kT \ln Z(N, V, T);$$

y la entropía S como:

$$(A5) \quad S = kT \left[\frac{\partial \ln Z}{\partial T} \right]_{N,V} + k \ln Z$$

Se pueden además obtener los valores medios de la entalpía y la energía libre de Gibbs, utilizando las conocidas relaciones termodinámicas clásicas [1]. Es decir, la obtención de las funciones termodinámicas microscópicas se pueden obtener a partir de los niveles de energía del sistema microscópicos a través de la función de partición Z. El ensamble canónico es en este caso pertinente, ya que en cada sistema aislado se esta conservando el número de partículas (electrones en la molécula aislada) del sistema. La comparación entre dos sistemas con diferentes números de partículas como es el caso

presente, en que cada átomo de hidrógeno se rompe homolíticamente, se obtiene simplemente haciendo la diferencia entre las propiedades referidas al sistema con N y $N-1$ electrones en cada caso. Este procedimiento es consistente con el modelo termodinámico, en el sentido que esas propiedades son tratadas coherentemente como funciones de estados, cuya variación depende exclusivamente de los estados iniciales y finales de cada sistema, sin importar la trayectoria que sigue el sistema para evolucionar entre ambos estados.

Las moléculas estudiadas en esta tesis pueden ser clasificadas como moléculas poliatómicas no lineales, las que están sujetas a un número de grados de libertad vibracionales de $3N-6$, en que N es esta vez el número de átomos. Esto implica que los modos vibracionales asociados a cada uno de ellas, es de $3N-6$ modos, asociados con las señales que se esperarían de su espectro infrarrojo.

Despreciando los términos traslacionales y rotacionales, el hamiltoniano molecular que da origen a los niveles discretos electrónicos y vibracionales se escribe simplemente como $H_t = H_{el} + H_{vib}$. Si se tiene en cuenta la aproximación de Born-Oppenheimer, que permite la separación de los movimientos electrónicos y nucleares, en función de la diferencia de sus respectivas energías cinéticas, entonces habrá un espectro de energías electrónicas y otro asociados a los estados vibracionales de cada nivel electrónico esencialmente desacoplados, es decir, la energía total se expresara simplemente como la suma de las contribuciones electrónicas y vibracionales, de modo que la función de partición canónica descrita en la ecuación (1) se factoriza naturalmente como:

$$(A6) \quad Z = Z_{\text{vib}}Z_{\text{el}}$$

Debido a la dependencia logarítmica de las funciones termodinámicas con la función de partición total, se sigue inmediatamente que las propiedades electrónicas y vibracionales se obtendrán empleando separadamente las densidades de los estados electrónicos y vibracionales respectivas. Para el caso del cálculo de la entalpía media (de formación, de acuerdo al protocolo que utiliza AM1), la entalpía se aproxima directamente con la energía electrónica media, asumiendo que no hay variaciones de presión y volumen. La estimación de la función de partición vibracional por otro lado requiere de un modelo. Este modelo es simplemente el modelo de oscilador armónico clásico, cuya energía es:

$$(A7) \quad E_{\text{vib}}(j) = \frac{1}{2} k_j (Q_0 - Q_j)^2,$$

en que Q y Q_j son las coordenadas normales asociadas a cada uno de los $3N-6$ modos normales de vibración, en la con referencia a una posición de equilibrio Q_0 . La función de partición vibracional requiere pues de los niveles de energía vibracionales $E_{\text{vib}}(j)$ y

de las constantes de fuerza k_j . Estas se obtienen a partir del cálculo de las segundas derivadas de la energía total con respecto a las $3N-6$ coordenadas generales Q_j , que forman la matriz Hessiana del sistema. El cálculo se hace en forma autoconsistente ya que junto a las $3N-6$ coordenadas Q_j , se deben determinar simultáneamente las energías e_j y las respectivas constantes de fuerza k_j . El procedimiento consiste simplemente en diagonalizar la matriz de segundas derivadas de la energía total del sistema molecular, llamada matriz hessiana, con respecto a las $3N-6$ coordenadas Q_j , mediante derivación numérica que esta implementada en el código AM1.

Con las funciones de partición electrónica y vibracional a mano, se obtienen las propiedades termodinámicas a partir de las expresiones (3)- (5).

I.2. REFERENCIAS

- 1 D. A. McQuarrie, *Statistical Mechanics*, Harper & Row Publisher, New York, San Francisco, London, Tercera Edición, 1993.

El hecho de tomar las derivadas de E con respecto a N a $v(\mathbf{r})$ fijo, equivale físicamente a tomar la derivada de una función potencial en valores pequeños de la coordenada de reacción. Debido esencialmente a que este proceso de derivación **no** considera los estados iniciales y finales del proceso descrito a lo largo de la coordenada de reacción, la información contenida en estas cantidades no se relaciona con los aspectos termodinámicos del proceso, ya que la susceptibilidad del sistema se está estimando dentro de un cuadro estático, en las vecindades de los reactantes. Sin embargo, por esta misma característica en la definición de los índices globales, lo que esta pendiente contiene como información, es la pendiente de la función potencial E hacia valores mayores de la coordenada de reacción. Considerar por ejemplo la derivada de E con respecto a la misma coordenada de reacción: lo que obtenemos en este caso, es que al comparar dos o más pendientes correspondientes a dos o más procesos relacionados químicamente, la inclinación de las respectivas pendientes dan una idea acerca de la localización del estado de transición de los distintos procesos que se compara. La localización es no exacta pero permite al menos tener una estimación acerca de cómo se ordenan las diferentes energías de activación de los procesos que se estudian. Dado que las energías de activación se relacionan exponencialmente con las constantes de velocidades de los procesos a partir de la relación de Arrhenius, se puede concluir que cualitativamente las derivadas de E con respecto a la coordenada de reacción contiene información acerca de los productos de control cinético (aquellos que se forman

Fukui, tal como esta definida en (A2), es una función normalizada a la unidad, ya que la densidad electrónica integrada en todo el espacio, debe normalizar al número total de electrones. Es en este sentido, que las funciones de Fukui regionales, definidas en torno a centros atómicos, representan una probabilidad de que el sistema despliegue en esa región, una reactividad específica. La forma condensada a átomos de este índice local se obtiene fácilmente aproximándola como la densidad electrónica del orbital de frontera α = HOMO, LUMO involucrado en la reacción. Así, para el caso de un ataque electrófilo o nucleofílico; con $\alpha = -$ (HOMO) o $\alpha = +$ (LUMO) respectivamente, la función local correspondiente se aproxima simplemente como:

$$(A3) \quad f^{\alpha}(\mathbf{r}) = |\Phi^{\alpha}(\mathbf{r})|^2$$

Haciendo una expansión LCAO en la densidad de frontera $|\Phi^{\alpha}(\mathbf{r})|^2$ se puede construir fácilmente la cantidad condensada a átomos en términos de la función de Fukui orbital [3]:

$$(A4) \quad f_{\mu}^{\alpha}(\mathbf{r}) = \sum_{\mu} |C_{\mu\alpha}|^2 + C_{\mu\alpha} \sum_{\nu} C_{\nu\alpha} S_{\mu\nu}.$$

La cantidad condensada al átomo k en la molécula, se obtiene simplemente sumando sobre todos los orbitales centrados en ese centro:

$$(A5) \quad f_k^{\alpha} = \sum_{\mu} |C_{\mu\alpha}|^2 + C_{\mu\alpha} \sum_{\nu} C_{\nu\alpha} S_{\mu\nu}; \mu \in k; \nu \text{ diferente de } \mu.$$

La función de Fukui radicalaria utilizada en esta tesis, es simplemente el promedio entre la función electrofílica y la nucleofílica, a saber:

$$(A6) \quad f_k^{\bullet} = \frac{f_k^+ + f_k^-}{2}$$

II.2. REFERENCIAS

1. Parr, R. G.; Yang, W., *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford Science Publications, Oxford, New York, (1989)
2. Parr, R. G.; Pearson, R.G., *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 7512, (1983)
3. Contreras, R.; Fuentealba, P.; Galván, M.; Pérez, P., *Chem. Phys. Lett.* **304**, 405, (1999)